

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST-GRADO

**Efecto anticonceptivo y post-coital del extracto etanólico
del *Desmodium molliculum* (HBK). DC. "Manayupa" en
ratas hembras cepa Holtzmann**

TESIS

para optar el Grado Académico de Magíster en Farmacología con
mención en Farmacología Experimental

AUTOR

Fidel Ernesto Acaro Chuquicaña

ASESOR

Jorge Arroyo Acevedo

Lima – Perú

2010

**A MARCELA Y MANUEL, MIS PADRES POR
DARME LA VIDA, CONOCER LA ÉTICA, JUSTICIA
Y LA RAZÓN DENTRO DE LA SOCIEDAD.**

**A MI AMOR SERBIA
POR SU CARIÑO Y COMPRENSIÓN
EN LOS DÍAS DE INVESTIGACIÓN**

**CON MUCHO CARIÑO A MILY POR SU APOYO
INCONDICIONAL, CONSTANTE PARA LA
REALIZACIÓN DE ESTA TESIS**

**A LOS DOCENTES DE MAESTRÍA
POR BRINDARME SUS SAPIENCIAS
Y EXPERIENCIAS**

**AL DR. JORGE LUIS ARROYO ACEVEDO
POR SU EXCELENTE ASESORAMIENTO
MUCHAS GRACIAS.**

ÍNDICE

Resumen

Abstract

I.	Introducción	1
II.	Marco teórico	2
2.1	Antecedentes.....	2
2.2	Bases teóricas.....	3
2.2.1	Fisiología reproductiva en ratas	3
2.2.2	Plantas y hierbas contraceptivas	10
2.2.3	<i>Desmodium molliculum</i> y contracepción	12
2.3	Definición de términos	14
III.	Materiales y métodos	16
3.1	Métodos	16
3.1.1	Tipo de estudio	16
3.1.2	Universo	16
3.1.3	Tipo de muestreo	16
3.1.4	Muestra	16
3.1.5	Unidad de muestreo	16
3.1.6	Criterios de inclusión	16
3.1.7	Criterios de exclusión	16

3.2	Procedimientos	17
3.2.1	Preparación del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i>	17
3.2.2	Manejo de los animales de experimentación.....	17
3.2.3	Screening fitoquímico	18
3.2.4	Procedimientos para el estudio del efecto Anticonceptivo del extracto etanólico d e <i>Desmodium molliculum</i>	18
3.2.5	Procedimientos para el estudio del efecto Postcoital del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i>	19
3.2.6	Análisis estadístico.....	20
3.2.7	Recolección de datos.....	20
IV.	Resultados	21
4.1	Del screening fotoquímico	21
4.2	Análisis descriptivo y pruebas estadísticas para el..... estudio del efecto anticonceptivo	21
4.3	Análisis descriptivo y pruebas estadísticas para el estudio del efecto postcoital	22
4.4	Estudio Anatomopatológico	27
V.	Discusión	32
VI.	Conclusiones	37
VII.	Referencias bibliográficas	38
VIII.	Anexos	45

Efecto anticonceptivo y post-coital del extracto etanólico del *Desmodium molliculum* (HBK). DC. “Manayupa” en ratas hembras de cepa Holtzmann

Resumen:

El objetivo de la investigación fue determinar el efecto anticonceptivo y postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* en ratas hembras adultas Holtzmann. La muestra fue de 80 ratas hembras seleccionadas de acuerdo a los criterios de inclusión, y divididas en 2 grupos, estando cada uno conformada por 5 subgrupos de 8 ratas hembras y ratas machos para el emparejamiento (1 macho: 2 hembras). 1) Grupo 1: 40 ratas para la evaluación del efecto anticonceptivo del extracto de *Desmodium molliculum* a una solución 100mg/mL vía oral en dosis 200mg/kg, 600mg/kg y 1000mg/kg. Se utilizaron dos grupos como controles suero fisiológico y Medroxiprogesterona en dosis 15mg/kg; 2) Grupo 2: 40 ratas para la evaluación del efecto post-coital del extracto *Desmodium molliculum* 100mg/mL vía oral a dosis 200mg/kg, 600mg/kg y 1000mg/kg. Se utilizaron dos grupos como controles suero fisiológico y Levonorgestrel a dosis de 50ug/kg. El efecto anticonceptivo se evaluó mediante la cuantificación de los indicadores gravidez, número de implantaciones y número de fetos; el efecto post-coital se evaluó mediante la cuantificación de los indicadores gravidez, número de implantaciones, número de fetos vivos y número de fetos muertos. El análisis estadístico fue realizado empleando el software SPSS versión 16.0 año 2009 para Windows. Se realizaron análisis descriptivos y pruebas estadísticas de significancia ANOVA.y Tukey Los resultados encontrados demuestran que el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* tiene un efecto anticonceptivo y post-coital. En conclusión, bajo las condiciones experimentales, de esta investigación el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* ha demostrado efecto anticonceptivo y poscoital en ratas Holtzmann hembras

Palabras claves:

Anticonceptivo, Post-coital, *Desmodium molliculum*, Plantas Anticonceptivas.

Effect post-coital contraception and the ethanol extract of *Desmodium molliculum* (HBK). DC. "Manayupa" in Holtzmann strain female rats

Abstract:

The objective of this research was to determine the postcoital contraceptive effect and the ethanol extract of *Desmodium molliculum* Holtzmann adult female rats. The sample was 80 female rats selected according to inclusion criteria, and divided into 2 groups, each being made up of 5 sub-groups of 8 male rats and female rats for mating (1 male: 2 females). 1) Group 1: 40 rats to evaluate the contraceptive effect of the extract of *Desmodium molliculum* 100mg/mL a solution orally at 200mg/kg, 600mg/Kg and 1000mg/kg. Two groups were used as controls saline and 15mg/kg dose medroxyprogesterone, 2) Group 2: 40 rats for assessment of post-coital effect of the extract *Desmodium molliculum* 100mg/mL 200mg/kg oral dose, and 600mg/Kg 1000mg/kg. Two groups were used as saline controls and a dose of Levonorgestrel 50ug/kg. The contraceptive effect was assessed by quantitative indicators pregnancy, number of implantations and number of fetuses, the post-coital effect was assessed by quantitative indicators pregnancy, number of implantations, number of live fetuses and number of fetuses. Statistical analysis was performed using the SPSS software version 16..0 2009 for Windows. Descriptive analysis was performed and statistical tests of significance ANOVA.y Tukey The results show that the ethanol extract of *Desmodium molliculum* has a post-coital contraceptive and. In conclusion, under experimental conditions of this study the ethanolic extract of *Desmodium molliculum* demonstrated and post-coital contraceptive effect in female rats Holtzmann

Keywords:

Contraception, Post-coital, *Desmodium molliculum*, Plants Contraceptive.

I. Introducción:

El control de la natalidad forma parte del sistema de planificación familiar de todas las sociedades a nivel mundial debido a que cuando está incrementada muchas veces conlleva problemas sociales, económicos y de salud a nivel familiar. En vista de esto, actualmente se realizan esfuerzos intensos para llevar y desarrollar nuevos sistemas y medios para el control de la natalidad. Uno de ellos es el desarrollo de contraceptivos orales efectivos (^{1, 2}). La fuente de los contraceptivos disponibles se ha desarrollado a partir de los principios activos de numerosas plantas que históricamente han sido utilizadas para reducir la fecundidad en diferentes culturas ancestrales, como es evidente en algunos libros, manuscritos y revisiones disponibles (³), y que mediante la investigación científica moderna se han confirmado los efectos de antifertilidad de dichas planta (⁴).

Una de las plantas en las que se ha reportado el uso folklórico para el control de la natalidad es la “Manayupa” o *Desmodium molliculum*. Esta planta está ampliamente distribuida en diversas zonas de nuestro país (⁵) Sin embargo, a pesar de su potencial efecto farmacológico en el control de la natalidad, en nuestro medio no se cuenta con un estudio serio que haya demostrado dicha propiedad y el alcance de sus efectos. Por ello, esta investigación se realizó para estudiar los efectos contraceptivos del extracto etanólico de esta planta, utilizando un modelo experimental en ratas Holtzmann

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Determinar los principales metabolitos secundarios mediante un estudio fitoquímico preliminar del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*; 2) Determinar el efecto anticonceptivo y postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*; 3) Comparar el efecto contraceptivo del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* con fármacos contraceptivos progestágenos; 4) Determinar los cambios histopatológicos a nivel de úteros en ratas hembras de experimentación tratados con extracto etanólico de *Desmodium molliculum*.

II. Marco teórico

2.1 Antecedentes

La planta *Desmodium molliculum* (H.B.K) DC., crece en diversas regiones del mundo(⁶) En nuestro país es conocida como “Manayupa” , “pata de perro”, “pie de perro” entre otras denominaciones populares, y particularmente crece en los andes de los departamentos de Ancash, Ayacucho, Cuzco, Huanuco, Junin, Cajamarca y Lima(⁷). Los usos en la medicina tradicional de las plantas del género *Desmodium* son como diurético, depurativo de la sangre, antihemorrágico, antiinflamatorio y contraceptivo oral(^{5,8}).

Los componentes activos identificados en la mayoría de las plantas de las especies de *Desmodium* son similares salvo ciertas variaciones en la proporción de compuestos específicos que se pueden aislar, es por ello que las propiedades farmacológicas de los extractos de diversas especies de plantas de este género se caracterizan por una similitud muy significativa(^{9,10}) En nuestro país Bonilla et al.¹¹, publicaron un estudio sobre la evaluación fitoquímica y actividad biológica de *Desmodium molliculum*, refiriendo como principales metabolitos activos a los flavonoides y su relación con los usos tradicionales.

Dentro de las especies del género *Desmodium*, es el *Desmodium adscendens* y *Desmodium molliculum* los más estudiados, y de los que se tiene referencia de uso folklórico como contraceptivo incluso en nuestro país(^{5,12,13}). Con respecto a los principios responsables de la propiedad contraceptiva de las plantas del género *Desmodium*, se han aislado e identificado mediante estudios in vitro y experimentos en animales diversos agentes tales como flavonoides, flavonas, flavones glicósidos(^{11,14,15,16}) esteroides y taninos (^{17,18}) como los principales responsables de la capacidad contraceptiva de dichas plantas e identificando sus principales formas de administración para lograr el efecto deseado.

En relación al *Desmodium molliculum*, se ha encontrado que posee taninos, flavonoides y esteroides, los cuales sustentarían una capacidad contraceptiva (^{19,20}). Sin embargo, hasta la actualidad no se ha determinado la relación entre la

dosis y sus principales efectos, además se desconoce los modos que puede ser mejor administrada para el adecuado control de la natalidad.

2.2. Bases teóricas:

2.2.1 Fisiología reproductiva en ratas

Muchos de los estudios que se han realizado sobre el control del ciclo ovárico de mamíferos estrales de ovulación espontánea y no estacionales, están basados en la información obtenida del ciclo estral de la rata, siendo las cepas de ratas Wistar y Sprague-Dawley las más utilizadas para la investigación sobre agentes contraceptivos(²¹). En experimentos de larga duración no se ha encontrado diferencias entre las cepas Wistar y el Sprague-Dawley con respecto al momento de la apertura vaginal (una de las características reproductivas importantes de referencia), situándolo entre el día 37 y 39 de vida, y sin embargo, se ha encontrado diferencias individuales dentro de la misma cepa, atribuyendo dichas variaciones estacionales a la composición del alimento y a otros factores desconocidos(²²). En vista de los datos encontrados en la literatura, en esta investigación se tomó como sujetos de experimentación a las ratas de la cepa Holtzmann, y las referencias que se detallan con respecto a otro grupo de ratas se harán a la especie mencionada.

En cuanto al ciclo de vida reproductivo, las ratas de esta especie poseen una vida media de 2 años siendo sexualmente maduros entre 60 a 90 días de edad. La gestación de la hembra dura de 22 a 24 días, con 8 a 12 nidadas por año, y cada nidada posee de 8 a 12 individuos con una supervivencia de 12 a 20 individuos por hembra al año(²²)

Las hembras de esta especie son poliéstricas continuas, anatómicamente tienen similitudes con el aparato reproductor del ratón, el infundíbulo está envuelto por una bolsa formada por el mesosalpirix, este es llamado el saco ovárico. Tiene el útero bicornio con la peculiaridad que poseen 2 cuellos uterinos, uno para cada cuerno, comunicados entre sí por una sola vagina (²³). El primer estro se da a los 40 a 75 días pero recién se cubre a los 90 días, y ya que el cruce temprano

produce partos más espaciados así como distocias en el parto de neonatos de menor peso y tamaño, la edad de mayor fertilidad es de 100 a 300 días(²⁴).

Hormonalmente, uno de los signos de maduración sexual de la hembra es la aparición de un patrón específico de hormona luteinizante (LH), circulante que se caracteriza por la repetición de picos agudos cada 30 a 60 minutos, lo que estimula la secreción ovárica de 17- β estradiol, la cual hacia el final del día 30 provoca la secreción de oleadas de LH que ayudan a estimular el desarrollo final del ovario. En el día 30 también se observa aumento de la prolactina en el plasma. Es importante resaltar que desde la pubertad esta hormona facilita el desarrollo y mantiene los receptores ováricos a LH necesarios para la secreción normal posterior de progesterona (²⁵).

En cuanto a las características anatomofisiológicas y los factores que la afectan, las hembras nacen con el canal vaginal cerrado, éste recién se abre a los 72 días de vida con un rango de 34 a 109 días, estando esta variación influenciada por factores nutricionales, genéticos y ambientales (²⁴). Y debido a esto la apertura vaginal, la primera ovulación, y el consecuente ciclo estral están correlacionados. En ciertas circunstancias, por ejemplo, si se dan cambios en la intensidad lumínica o en humedad ambiental o ante situaciones estresantes que actúan a través de la glándula pineal y adrenal, estos fenómenos pueden disociarse. Esto podría deberse a niveles inferiores a los normales de estradiol, los que si bien alcanzan para producir la maduración del epitelio vaginal, no son suficientes para estimular la LH y la hormona folículo estimulante (FSH), en cantidad necesaria para producir ovulación (²⁶).

2.2.1.1. Ciclo Estral

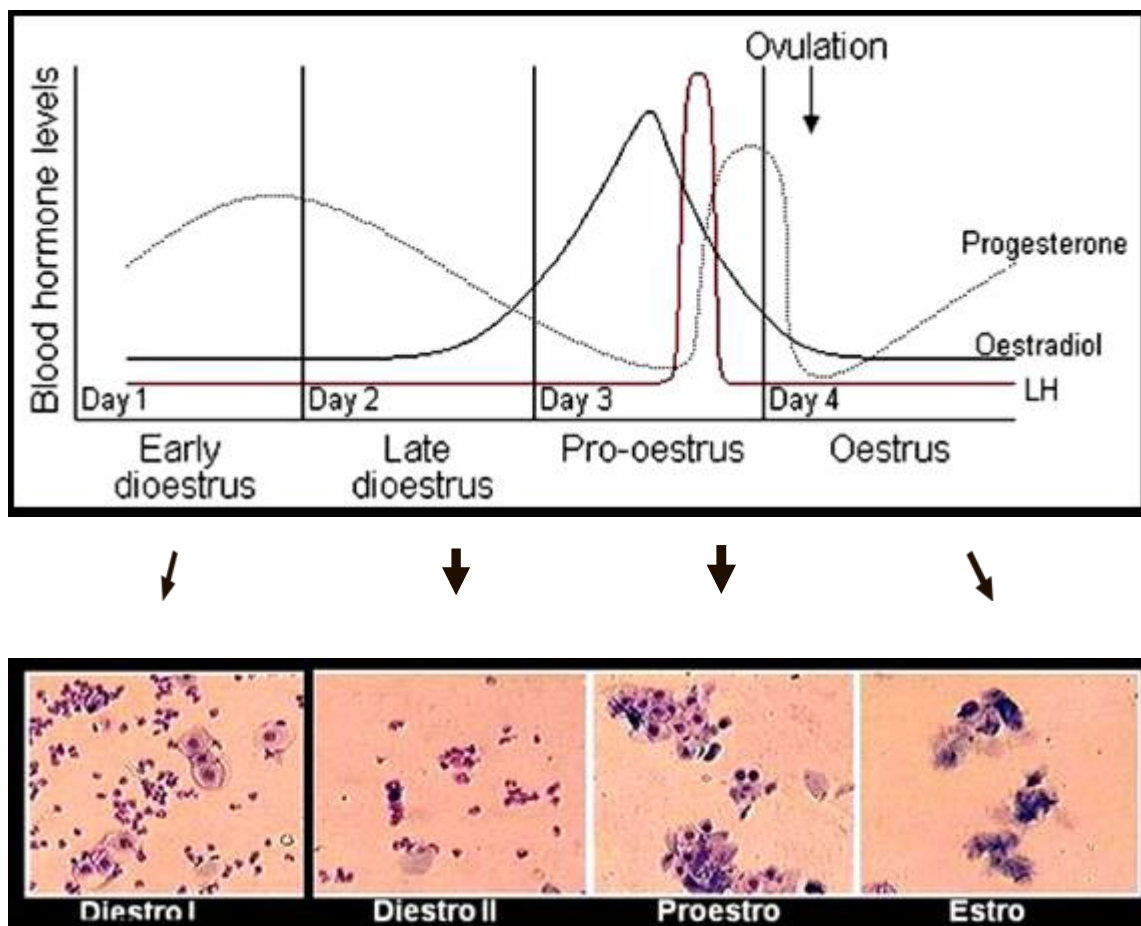
La palabra *estro* es una adaptación latina de la palabra griega "oistros" que significa frenesí o deseo desenfrenado. Este término fue usado por primera vez por Heape (²⁷), para describir el "periodo especial del deseo sexual de la hembra" y distinguirlo del "celo" en el macho(²¹). La rata de laboratorio es un mamífero no estacional de ovulación espontánea y poliestrica, es decir, que el ciclo ovárico se continua todo el año. La ovulación no es dependiente de la sobre estimulación nerviosa y ocurre cada 4 ó 5 días a través de todo el año las que Heape describió en las distintas etapas del ciclo (^{27,28}).

El ciclo estrogénico en ratas se extiende, como lo describe Long et al.⁽²⁸⁾, por 4 días y es dividido en cinco periodos. En mucho de los casos han mostrado que el ciclo se extiende frecuentemente hasta cinco días. La separación de estos estadios depende de la examinación del contenido vaginal y su correlación con los cambios ováricos y uterinos ⁽²⁸⁾. En los ciclos de cinco días el incremento del estradiol antes de la ovulación es más gradual y prolongado con un período de acción vaginal mayor. Estos ciclos de prolactina mantiene activo el cuerpo lúteo durante tres días con la consiguiente prolongación de los efectos de la progesterona. Estos cambios presentan más fácilmente pseudopreñez, también mayor índice de preñez por tener un período de receptividad sexual más largo ⁽²⁹⁾.

Se ha establecido que durante el ciclo estral de la rata ya sea de 4 ó 5 días de duración, se observan dos incrementos transitorios en la secreción de progesterona, uno en la tarde del proestro (incremento pre ovulatorio), y otro incremento post-ovulatorio durante el metaestro ⁽³⁰⁾, mientras que el incremento post-ovulatorio es debido al incremento en la secreción de progesterona del grupo de nuevos cuerpos lúteos formados durante el ciclo ⁽³¹⁾. Las ratas con ciclos de 5 días pueden ser diferenciadas de las de 4 días determinando la secreción de progesterona post-ovulatorio, la cual permanece significativamente más alta durante el diestro en ratas de 5 días que en 4 días ^(32,33).

En las ratas cíclicas de 4 días se ha establecido que la secreción de progesterona durante el diestro intensifica la retroalimentación negativa del estradiol sobre la secreción basal de la hormona luteinizante, y que cuando los niveles de progesterona decaen (regresión luteal), la secreción de estradiol y LH incrementan, y ocurre la ovulación ^(33,34)

Figura 1
Variaciones Hormonales Durante el Ciclo Estral y Citología de
Raspado vaginal de Ratras



Fuente: <http://137.222.110.150/calnet/Ovarian/page2.htm>⁽³⁵⁾

Las características fisiológicas, morfológicas y citológicas del ciclo estral de la rata según Freeman, 1994; Long et al ^(21,28) son:

1) Diestro:

Duración aproximadamente 57 horas. En el fluido vaginal se hallan células epiteliales y principalmente leucocitos. El pH de la vagina es de 6.1. El epitelio uterino está en plena regeneración que culmina en este período y la luz del órgano es de 25 mm. La caída de los niveles de estrógenos desbloquea la secreción de LH y FSH, que comienzan a aumentar, iniciando el desarrollo de un nuevo grupo de folículos.

2) Proestro:

El proestro dura aproximadamente 12 horas, en esta etapa el pH vaginal 5.4, la vagina se torna seca, los ovarios están en plena producción folicular. El diámetro de la luz uterina es de 5 mm. células cornificadas ocasionales.

3) Estro:

Duración aproximada 12 horas, la vulva está inflamada y las paredes de la vagina presentan un aspecto seco, blanquecino y lustroso, el pH es de 4.2, aparece flujo vaginal abundante. El ovario se detecta folículos grandes y óvulos completamente maduros. Los estrógenos son los responsables de los cambios uterinos y vaginales, el deseo del apareamiento y la liberación de LH-FSH en los dos días siguientes. Las hembras tienen un comportamiento que permite reconocerlo. En fase temprana la hembra responde a la estimulación mecánica de la piel, de la cabeza y nuca con un ligero temblor en las orejas. Las células cornificadas predominarán, tanto como progresa la estrogenicidad.

4) Metaestro:

4.1) Metaestro I.-

Duración aproximada de 15 horas. Fluido vaginal caseoso y abundante, se observa células pavimentosas (células grandes planas nucleadas). La vulva se mantiene inflamada. El endometrio se encuentra en degeneración vacuolar. Se produce pico de LH consecuentemente la ovulación múltiple y espontánea, este proceso está relacionado con la hora del día e influenciado por el ciclo luz oscuridad. Un ciclo de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad y con la temperatura ambiente entre 20-22°C favorecen la función reproductiva con independencia de las variaciones estacionales. El pico de LH determina el final del período de liberación de estrógenos y el comienzo de la secreción de progesterona por los cuerpos lúteos. Esta induce el comportamiento materno y la secreción uterina.

4.2) Metaestro II.-

Duración aproximada de 6 horas. En el frotis vaginal se observan células cornificadas y leucocitos. La vulva retorna a la normalidad y las paredes vaginales

se encuentran húmedas. En el útero el endometrio comienza a regenerarse y los óvulos liberados se hallan en el oviducto.

2.2.1.2. Hormonas en el Ciclo Reproductivo de la Rata:

Los estrógenos se mantienen en niveles bajos al inicio de la fase folicular y van incrementando su secreción paulatinamente hasta alcanzar su pico máximo justo antes de la ovulación en donde las concentraciones de estrógeno dan como resultado el disparo de los picos de hormonas luteinizantes y folículo estimulante (LH y FSH). La ovulación en mamíferos es un fenómeno biológico distintivo el cual requiere de la ruptura del tejido sano de la superficie del ovario..La ovulación se presenta a la mitad del ciclo reproductor mediante la influencia de las hormonas gonadotróficas (FSH y LH) producidas por la adenohipofisis. En las ratas la ovulación ocurre entre el comienzo del proestro y el final del estro (^{36,37}).

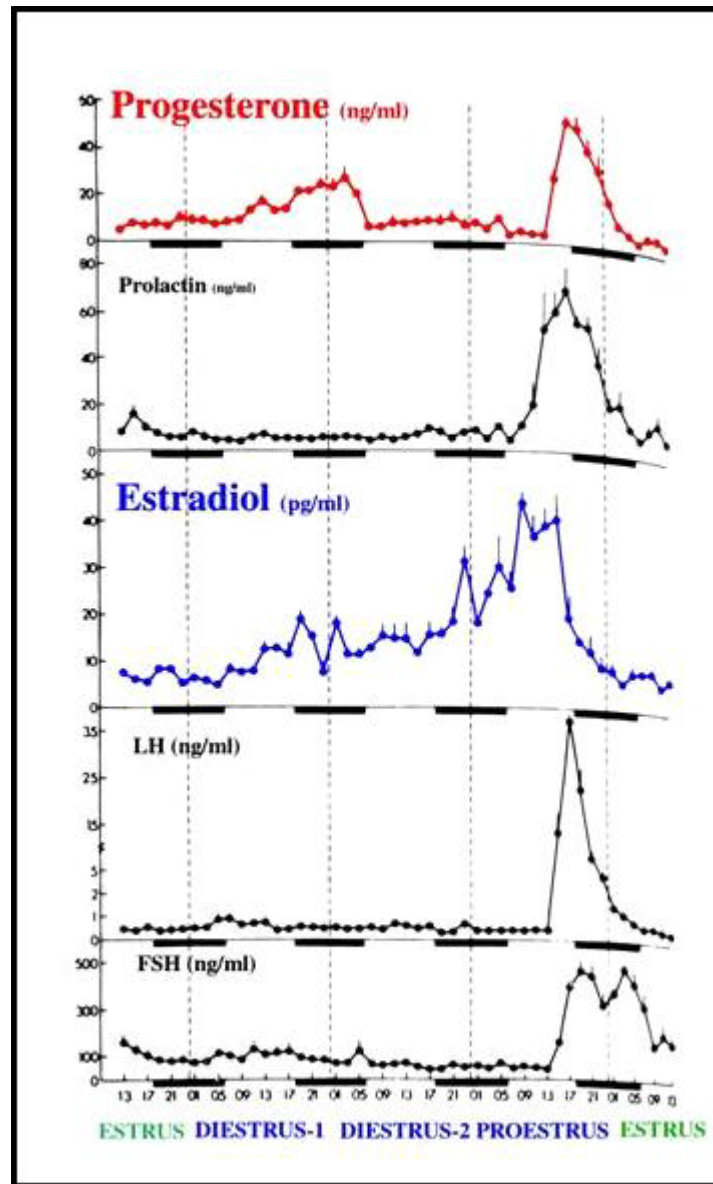
La regulación de la producción de estrógenos por los ovarios es uno de los eventos fisiológicos más importante que marcan la espontaneidad e inducción del ciclo estral (³⁸). Los estrógenos ejercen sus acciones biológicas sobre órganos blancos a través de la unión a un receptor de estrógenos específico (RE), el cual es miembro de la superfamilia de receptores esteroideos (³⁹).

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), los esteroides gonadales y la inhibina se encargan de la regulación de la LH y FSH. La inhibina suprime la síntesis y la liberación de FSH, siendo su papel principal la regulación de la secreción de FSH (⁴⁰). La inmunización pasiva contra la inhibina produce un incremento en la concentración de FSH plasmática (⁴¹). Por lo tanto, si se presentan cambios en la secreción de inhibina durante el período pre-ovulatorio se presenta un pico secundario de FSH, lo cual resulta en diferencias en los patrones de secreción de LH y FSH en este período. Sin embargo, aún no está claro cuál es la contribución relativa de estrógenos e inhibina en la regulación de la secreción de gonadotropinas (⁴²).

La progesterona se mantiene en concentraciones bajas durante la fase folicular y presenta su pico máximo en la fase luteal debido a que el cuerpo lúteo secreta principalmente progesterona. Esta hormona tiene como función principal estimular la secreción de las glándulas endometriales y preparar el endometrio para la

implantación del huevo fecundado, es un regulador del desarrollo folicular de la liberación de gonadotrofinas preovulatorias y sobre la ovulación. Dichas acciones son ejercidas a través de su interacción con receptores de progesterona en el hipotálamo, glándula pituitaria y ovarios (^{43,44}).

Figura 2
Variaciones Hormonales en el Ciclo Estral de las Ratas



Fuente: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3ra ed. Elsevier academic press. 2006 (2). Chapter 43. Neuroendocrine controls of the ovarian cycle of the rat. p:2334(.³⁶).

2.2.2 Plantas y Hierbas Contraceptivas:

Desde épocas primitivas se utilizaban hierbas y extractos acuosos de plantas que se consideraba poseían propiedades anticonceptivas. Se conoce el empleo en Egipto antiguo de preparados intravaginales que actuaban como barrera y/o espermicida, y fue Aristóteles quien primero mencionó la anticoncepción y recomendó el aceite de cedro para impedir la concepción. Hoy se conoce la propiedad el aceite de reducir la movilidad de los espermatozoides. En la antigua Grecia se emplearon diversidad de productos en forma de pastas y aplicaciones locales, como el uso de goma de cedro, miel, corteza de pino, granada pulverizada, aceite de mirto y otros extractos. Esta cultura prescribía la anticoncepción poscoital, basada en un procedimiento en el que la mujer asumía en cuclillas para intentar expulsar el semen de la cavidad vaginal al aumentar la presión intraabdominal. Tanto las civilizaciones griegas como romanas utilizaron el aborto como método de control de la natalidad. Los romanos emplearon plumas de pato y los griegos la inserción de sustancias a través del cuello uterino. También en nuestro continente se tiene información sobre el uso de hierbas y raíces de plantas con propiedades contraceptivas por los indios norteamericanos (^{45,46}).

Un gran número de plantas, tanto aquellas seleccionadas al azar y aquellos que son conocidos para prevenir el embarazo en la medicina folklórica/tradicional, han sido sometidos a evaluaciones de su potencial antifertilidad en animales. Diversas hierbas y otros componentes han sido evaluados predominantemente con resultados mixtos. Algunos de ellos han fallado en exhibir alguna actividad en el laboratorio, aunque los resultados negativos obtenidos por los investigadores pueden ser o no válidos por las especies animales, dosis insuficiente o debido a una limitada cantidad de los principios activos presentes en la planta que pueden hacerlo suficientes para obtener una respuesta positiva en una dosis dada (¹).

Las técnicas usadas para la extracción de los ingredientes bioactivos de estas hierbas son anotados por usar etanol o metanol, y así poder causar algunos de los efectos anticonceptivos ⁴⁷, y entre los principios activos responsables de la actividad contraceptiva se tienen a los compuestos esteroides con actividad estrógena o antiestrógena que incluyen flavonas, isoflavonas como la

genisteína y derivados de coumestano se identifican coumestano que se identifican en plantas y hongos (⁴⁸).

Los flavonoides: isoflavonas, cumarinas son sustancias conocidas como fitoestrógenos no esteroideos, estos producen infertilidad en animales (⁴⁹). Una remarcable diversidad de compuestos naturales y sintéticos ha mostrado mimetizar los efectos biológicos del 17-beta estradiol por virtud de su capacidad de unirse y activar el receptor nuclear de estrógenos (⁵⁰). Con respecto a los flavonoides, dos flavonas apigenina y luteína aislados del *Striga orobanchioides*, fueron investigadas por sus propiedades endocrinas y anticonceptivas, y en dosis graduales de estos componentes 5-25mg/kg de peso corporal/día, cuando se administraron a partir del día 1 al día 4 del embarazo, produjeron un efecto dosis dependiente y tuvieron significativa actividad contra la implantación, causando la administración oral de estos compuestos un aumento significativo en el peso uterino de las ratas inmaduras ovariectomizadas, y también se produjo el aumento en el espesor del endometrio en comparación a las ratas control, lo cual indicó su actividad anticonceptiva (⁵¹).

Asimismo, la planta medicinal peruana *Bidens andicola* (Compositae), presenta isómeros de flavonas llamadas chalconas, y el extracto de esta planta de uso tradicional tiene propiedades anticonceptivas cuando se administran por vía oral, aunque no está claro si la chalcona es el agente activo responsable (⁵²). Por otra parte, en un estudio experimental se demostró que el extracto alcohólico de la parte aérea de la planta *Rivea hypocrateriformis* eran eficaces en la anti-implantación e interrupción de embarazo de ratas albinas, causando alteraciones durante las gestaciones precoces, debido a la presencia positiva de taninos alcaloides, saponinas y compuestos fenólicos (⁵³).

En ese mismo sentido, Bhargava (¹⁵) determinó también, que la presencia de flavonoides serían los responsables de la actividad farmacológica contraceptiva. Siendo corroborado este hallazgo en el extracto de éter de petróleo de las semillas del *Citrus medica* "limón" debido a la presencia de los flavonoides, los cuales tienen al efecto estrogénico como mecanismo responsable de su actividad (¹⁶).

En cuanto al efecto de los estrógenos y su actividad contraceptiva, Okwuasaba et al (¹⁷) afirmaron que los estrógenos aceleran el pasaje del huevo a través del tubo uterino y el útero y condicionan la expulsión prematura del huevo, presumiendo sea la base de su actividad anticonceptiva. Estos investigadores estudiando un preparado con semillas *Ricinus communis* (higuerilla), evidenciaron que la actividad estrogénica se deba a la presencia de esteroides vegetales, los cuales inducen la apertura vaginal, favorecen el aumento de las células cornificadas y la disminución de los leucocitos. Por otro lado Pakrashi et al (¹⁸) en el estudio realizado en ratones, investigaron las hojas del *Ananas comosus* (Piña) sobre el proceso antifertilidad, determinando su actividad abortiva durante el día 1 al día 7, cuando se administraron por vía oral en dosis única 30mg/kg. Este efecto se debería a la presencia de esteroides, tipo peróxido de ergosterol mostrando máxima actividad abortifaciente durante la gestación (¹⁸).

Así, queda demostrado que la administración experimental de extractos o preparados de las plantas referidas, a las cuales se les atribuye un efecto contraceptivo, producen disrupción del balance estrógeno y progesterona lo que resulta en producir cambios en las características reproductivas de los animales de experimentación, estando estos efectos relacionados a la composición particular de que planta utilizada (^{1,2,54}).

2.2.3 *Desmodium molliculum* y contracepción

Desmodium molliculum (HBK) D.C popularmente conocida en nuestro país como “Manayupa”, runamanayupana, “pata de perro”, “pie de perro”, “pega-pega” y en quechua “allcopachaque” (⁵⁵). Es una planta perenne que mide aproximadamente 30 centímetros de altura. Pertenece a la familia Fabaceae, crece en forma silvestre en los Andes entre 1000-3000 msnm principalmente en los departamentos de Huanuco, Junín, Cuzco, Ayacucho, Lima y Cajamarca (⁷).

Según Brako et al, (⁵⁶) el *Desmodium molliculum* (HBK) DC, presenta los siguientes sinónimos botánicos: *Hedysarum molliculum* HBK; *Meibomia mollicula* (HBK) Kuntze, y comprende cerca de 450 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo.

La identificación taxonómica de la planta fue realizada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Constancia N° 061-USM-2008, véase en anexo 6), y tiene la siguiente posición taxonómica según el sistema de clasificación de Cronquist (⁵⁷):

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Genero: *Desmodium molliculum* (HBK) DC

Nombre Vulgar: “Manayupa”

En relación al *Desmodium molliculum* y la contracepción, a pesar de ser ampliamente referida en la medicina tradicional de nuestro país y en nuestra región por poseer propiedades contraceptivas (^{1,2,20}) existen escasos estudios serios sobre los efectos del extracto alcohólico de *Desmodium molliculum*. No obstante, en la literatura científica se encuentra referencia de diversos estudios a nivel mundial, que refieren que muchas especies del género *Desmodium* poseen actividad contraceptiva: Schultes et al, (⁵⁸) reportan que la especie *Desmodium* es utilizado como “limpiador del tracto urinario y utero”, regulador del flujo vaginal y hemorragias. Por otra parte, Kvist et al (⁵⁹) reportó que en Ecuador y en el área de la parte baja del Río Ucayali de la Amazonía peruana el *Desmodium uncinatum* es usado como abortivo.

Flores et al (⁶⁰) determinó en un estudio preliminar, el efecto anticonceptivo del extracto alcohólico del *Desmodium adscendens* en ratas hembras. Tournon et al (⁶¹) dedicó su atención al estudio de la etnomedicina de algunas comunidades Shipibo Conibo del Ucayali, e identificó varias plantas medicinales, reportando sus propiedades medicinales entre ellos las anticonceptivas, donde mencionaron al *Desmodium canum*. Por otro lado Caius (⁶²), refiere el uso tradicional como emenagogos del *Desmodium retroflexum* DC en Asia y *Desmodium repandum* (Vahl) DC, en Africa. En tanto que Jain (⁶³), refiere la utilización de la especie *Desmodium microphyllum* (Thunb) DC en la zona central y oriente de Asia como abortivo. Maurya et al (¹) mencionan a la especie *Desmodium retroflexum* DC en la clasificación de plantas con actividad antiinfertilidad en la Medicina Folklórica

India. Asimismo, Dharmani et al (⁶⁴) refiere a la especie *Desmodium gangeticum* DC posee propiedad antiinfertilidad. Otra investigación refiere que la especie *Desmodium adscendes* (Sw) DC, es usada en la medicina tradicional de la amazonía, para tratar infecciones vaginales, descensos, como contraceptivo y esterilizante para las mujeres en infusión (¹²).

Por lo antes referido, y en virtud de la similitud en la presencia de los componentes activos entre las especies del género *Desmodium*, los cuales serían responsables de su propiedad contraceptiva, en esta investigación se buscó determinar la actividad anticonceptiva y postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*, así como comparar la actividad contraceptiva del extracto con fármacos contraceptivos progestágenos, y determinar los cambios histopatológicos uterinos provocado en ratas hembras cepa Holtzmann bajo condiciones experimentales detalladas más adelante.

2.3. Definición de términos:

1. Anticonceptivo: Agente que tiene actividad anticonceptiva de naturaleza farmacológica, principalmente con acciones de carácter hormonal o antihormonal que llegan a modificar de manera sustancial los mecanismos de ovulación, fecundación o implantación del huevo fecundado (⁶⁵).

2. Postcoital: Tipo de contracepción en la cual se administra un agente farmacológico, generalmente hormonal, tras una relación sexual sin protección para evitar un embarazo no deseado (⁶⁶).

3. Anticoncepción de Emergencia: Conjunto de métodos anticonceptivos que pueden utilizar las mujeres después de un coito no protegido para evitar un embarazo no deseado (^{67,68}).

4. Antifertilidad: Condición provocada por un agente que posee un efecto potencial de inducir la infertilidad en el macho y en la hembra como contraceptivo vaginal y oral, puede también evitar la implantación (⁶⁹).

5. Antiimplantación: Mecanismo que impide que un óvulo fecundado en su estadio embrionario de blastocito llegue a implantarse en el endometrio, induciendo cambios en la pared del útero, y así evitarse el embarazo (⁷⁰).

6. Medicina Tradicional o Folklórica: Es el conjunto de conocimiento y prácticas que tiene como fundamento el saber médico ancestral de la población modificado a lo largo del tiempo. Es una práctica que se transmite por la tradición familiar o comunitaria, que tienen sus propios agentes de salud y sus ideas específicas sobre la enfermedad y curación ⁽⁷¹⁾.

7. Extracto de plantas: Preparado líquido a partir de plantas que contienen compuestos farmacológicamente activos extraídas con agua o con otro tipo de solvente tales como etanol, benceno, cloroformo ⁽⁷²⁾.

8. Aborto: Interrupción del embarazo. Consiste en la pérdida o expulsión de todo o parte de la placenta y membranas fetales con feto o sin él, vivo o muerto, antes de la semana 20 de embarazo y/o con un peso menor de 500g ⁽⁷³⁾

III. Materiales y métodos:

3.1 Métodos:

3.1.1 Tipo de estudio:

Experimental, longitudinal y prospectivo.

3.1.2 Universo:

El universo del presente trabajo de investigación estuvo conformado por ratas de la cepa Holtzmann.

3.1.3 Tipo de muestreo:

El tipo de muestreo fue no aleatorio, por conveniencia.

3.1.4 Muestra:

De acuerdo a las investigaciones anteriores fueron 80 ratas hembras y 40 ratas machos de raza cepa Holtzmann del Instituto Nacional de Salud del Perú, los cuales fueron divididos en 2 grupos de 40 ratas, cada uno con 5 subgrupos de 08 ratas hembras por cada subgrupo. Cada uno de los sujetos de investigación cumplieron con los criterios de inclusión para el presente trabajo de investigación.

3.1.5 Unidad de muestreo:

Las unidades de muestras fueron conformada por ratas hembras adultas, fértiles y en período reproductivo.

3.1.6 Criterios de inclusión:

- Los pesos de las ratas no deben diferir de 10 g y deben tener un promedio por grupo de 200 g.
- La edad de las ratas debe estar comprendida entre 4-6 meses.
- Cada grupo incluyó ratas hembras en igual número y fueron fertilizadas con un número igual de machos.

3.1.7 Criterios de exclusión:

- Ratas que no estaban en edad fértil.
- Ratas que estaban grávidas.
- Ratas que después del emparejamiento no hayan sido fecundadas.
- Ratas que presentaban hemorragia excesiva después de la preparación.

3.2 Procedimientos:

3.2.1 Preparación del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*:

El material de la planta usada en este estudio farmacológico posterior, se recolectaron las partes aéreas de poblaciones silvestres en el valle de los baños del Inca del departamento de Cajamarca durante los meses Julio-Agosto del año 2005. La planta fue identificada y autenticada por el Biólogo Severo Baldeón en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos(anexo 6).

La técnica utilizada para la preparación del extracto se tomó en cuenta la de Flores et al.⁽⁶⁰⁾ : Las partes aéreas recolectadas fueron llevadas a una cámara de secado con menos de 40°C durante un periodo de 72 horas, y luego fue pulverizada, obteniendo un polvo seco pulverizado, que fue empleado en la preparación del extracto alcohólico.

El polvo seco final fue mezclado con alcohol etílico (96º) el cual se dejó macerar por 5 días, para una adecuada extracción de sustancias polares y no polares. Al término de los 5 días se filtró en alcohol, obteniendo el extracto activo, el cual fue evaporado a 40°C durante 48 horas ⁽⁶⁰⁾. El extracto seco se utilizó para las respectivas diluciones y administración en los animales de experimentación.

3.2.2 Manejo de los animales de experimentación:

Los animales durante la investigación fueron manejados siguiendo las normas para el manejo ético de animales de experimentación descritas por Sharp PE ⁽⁷⁴⁾.

Se emplearon 80 ratas hembras (2-4 meses de edad) y 40 ratas machos de la cepa Holtzmann en edad reproductiva. Las ratas hembras tuvieron un peso promedio entre 180 a 200 g y los machos 280 a 300 g. Estos animales fueron obtenidos del Instituto Nacional de Salud Centro Nacional de Alimentación y Nutrición.

La parte experimental fue realizada en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNMSM durante los meses octubre-diciembre del año 2005. En dicho lugar se

mantuvieron las condiciones de temperatura (22°C), ciclo de luz (12 horas de luz y 12 de oscuridad), con dieta balanceada y agua libre.

Las ratas fueron divididas en dos grupos grandes: Grupo 1 para experimentar el efecto anticonceptivo; y Grupo 2, para experimentar el efecto postcoital. A su vez cada grupo fue subdividido en cinco subgrupos, teniendo al final la siguiente disposición:

i) Grupo A para experimentar el efecto anticonceptivo:

Grupo A1 suero fisiológico a dosis de 5ml/kg

Grupo A2 extracto de *Desmodium molliculum* a dosis de 200mg/kg

Grupo A3 extracto de *Desmodium molliculum* a dosis de 600mg/kg

Grupo A4 extracto de *Desmodium molliculum* a dosis de 1000mg/kg

Grupo A5 Medroxiprogesterona a dosis 15mg/kg

ii) Grupo B para experimentar el efecto post-coital:

Grupo B1 suero fisiológico a dosis de 5 ml/kg

Grupo B2 extracto de *Desmodium molliculum* a dosis de 200mg/kg

Grupo B3 extracto de *Desmodium molliculum* a dosis de 600mg/kg

Grupo B4 extracto de *Desmodium molliculum* a dosis de 1000mg/kg

Grupo B5 Levonorgestrel a dosis de 50ug/kg

3.2.3. Screening Fitoquímico ⁽⁷⁵⁾

Se uso la detección preliminar para los diferentes constituyentes químicos de la planta en extracto seco, se realizó reacciones de identificación o coloración para determinar la presencia o ausencia de metabolitos activos haciendo uso de reactivos específicos realizándose ensayos para detectar alcaloides, compuestos fenolicos, taninos, aminoácidos, esteroides y saponinas basado en la aplicación de pruebas de coloración y precipitación.

3.2.4. Procedimiento para el estudio del efecto anticonceptivo del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*:

Se realizó esta parte del experimento siguiendo la técnica descrita por Nwafor et al ⁽⁷⁶⁾.

Antes de empezar la distribución de los animales, las ratas hembras tenían un ciclo estrogénico regular, el cual fue confirmado por análisis de residuos

vaginales. La secreción vaginal se recogió con una pipeta de vidrio en solución salina normal (NaCl 0,9%) se introdujo en la vagina de cada rata, de forma superficial, utilizándose portaobjetos de vidrio. El material sin teñido, ni manchas se observó en un microscopio de luz a 10X y 40X de lentes objetivo. Los tipos de células epiteliales se reconoce la cornificación, un frotis de estró se compone de células cornificadas anucleadas y los pequeños redondos son los leucocitos. La proporción entre estas células fueron usadas para determinar las fases del estró de acuerdo a Long & Evans⁽²⁸⁾. Las ratas que se encuentran en ciclo estral proestro fueron seleccionadas, con ratas machos de fertilidad probada, en la proporción 2:1 y examinada al día siguiente por la mañana para la prueba de copulación. Las ratas que exhiben grupos gruesos de espermatozoides en su frotis vaginal fueron separados y ese día fue designado como día 1 de la gestación: durante 1 semana se le administró el extracto etanólico de las partes aéreas de la planta *Desmodium molliculum* “manayupa” a los respectivos grupos de experimentación, así como también el suero fisiológico a través de la sonda intragástrica a sus respectivos grupos, mientras que la medroxiprogesterona se administró vía intramuscular. Durante este período se evitó la presencia de los machos. El día 7 se adicionó una rata macho por cada dos ratas hembras en cada grupo hasta el día 15.

A los 10 días del embarazo las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital solución 30mg/ml a dosis de 1ml/100g y laparatomizadas para el registro del indicador macroscópico preñez y los indicadores microscópicos número de implantes y número de fetos.

3.2.5. Procedimiento para el estudio del efecto postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*:

Se realizó esta parte del experimento siguiendo la técnica descrita por Shirishailappa et al ⁽⁷⁷⁾, Muller et al ⁽⁷⁸⁾.

Las ratas con comprobada fertilidad y ciclo estrogénico regular fueron enjauladas por una noche con machos de probada fertilidad en una proporción de 2: 1 (hembra: macho). A la mañana siguiente las ratas hembras fueron examinadas por evidencia de copulación. Los animales que mostraban grupos gruesos de espermatozoides de vagina fueron separadas y ese día se designó como el día uno del embarazo. Luego se separó al macho. A continuación se administró el extracto etanólico de las partes aéreas de la planta *Desmodium molliculum*

“manayupa” respectivamente a cada subgrupo por vía oral a través de la sonda intragástrica desde el día 1 al 7 de embarazo.

A los 7 días del embarazo las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital y laparatomizadas para el registro del indicador macroscópico preñez y los indicadores microscópicos número de implantes, número de fetos vivos y número de fetos muertos

Se remitieron las muestras uterinas conservadas en formol al 10% para posterior estudio histopatológico al servicio de anatomía patológica del Hospital Loayza, donde se realizaron los cortes histológicos quedando la lectura de láminas para posterior interpretación, permaneciendo los observadores de los cortes histológicos, ciegos al tipo de muestra para evitar la subjetividad

3.2.6. Análisis estadístico:

Se utilizó el programa Excel del paquete Office 2003 Windows para la realización²⁰ de la interpretación descriptiva de los datos y el desarrollo de los respectivos gráficos. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa de software SPSS versión 16 para Windows 2009. Las pruebas para el análisis de la significancia estadística utilizadas fueron la prueba ANOVA y Tukey ($p < 0.05$).

3.2.7. Recolección de datos

Para el registro de datos, se preparó la ficha de recolección de datos, cuyo modelo figura en el presente trabajo en la sección de ANEXOS

IV. Resultados:

4.1. Del Screening Fitoquímico:

Se obtuvo un extracto etanólico con aspecto de masa homogénea, consistencia blanda, color verde petróleo, libre de partículas extrañas, el rendimiento fue de 2% de planta entera. El estudio fitoquímico en determinaciones cualitativas efectuadas demostró que los flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, esteroides, saponinas, alcaloides y carbohidratos, estuvieron en mayor cantidad en la fracción (Anexo 3, Tabla 1)

4.2. Efecto del tratamiento anticonceptivo:

En la Figura 1 se observa, de manera descriptiva, que existe asociación entre el efecto anticonceptivo del extracto de *Desmodium molliculum* y el indicador Gravidéz. También se gráfica que no se observó una relación entre el aumento de la dosis del extracto investigado y el indicador Gravidéz.

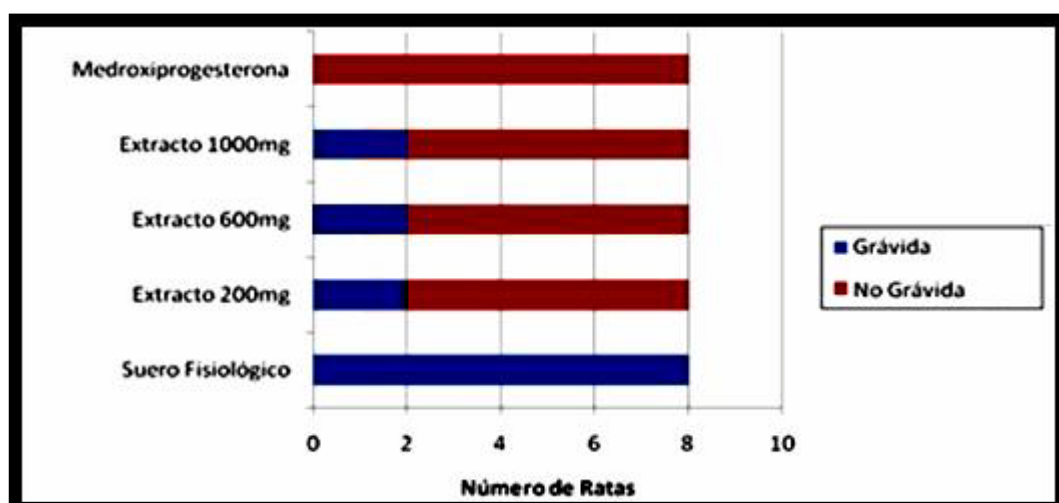


Figura 1. Asociación entre Actividad Anticonceptiva y Gravidéz en Ratas Holtzmann

En la Figura 2 se observa, de manera descriptiva, el efecto anticonceptivo del extracto de *Desmodium molliculum* y los indicadores microscópicos para la evaluación del efecto anticonceptivo: número de implantaciones y número de fetos. Se puede notar claramente que el extracto tuvo un efecto marcado en relación al suero fisiológico y menor que la Medroxiprogesterona según la concentración del extracto para ambos indicadores, siendo este hallazgo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). También se observa mayor relación entre

el aumento de la dosis del extracto investigado y los indicadores microscópicos, aunque esta fue estadísticamente significativo para los subgrupos extracto y medroxiprogesterona frente al subgrupo suero fisiológico ($p<0,05$); mientras que no hubo diferencia estadística significativa entre los subgrupos extracto y el subgrupo medroxiprogesterona ($p<0,05$) (ver anexo 2, tablas 1,2,3 y 4).

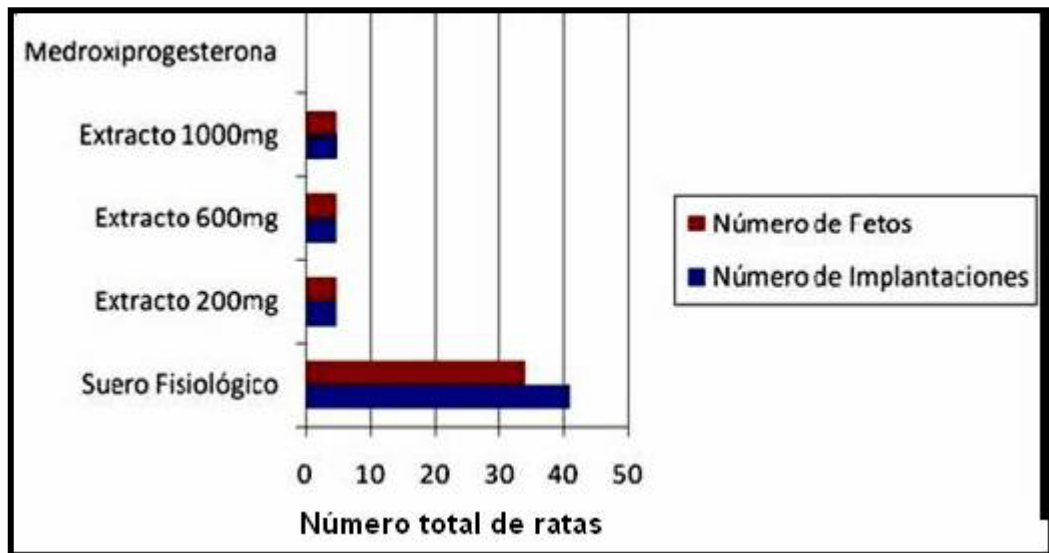


Figura 2. Efecto Anticonceptivo según Indicadores Microscópicos

4.3. Efecto del tratamiento Poscoital:

En la Figura 3 se observa, de manera descriptiva, que existe asociación entre el efecto Postcoital del extracto de *Desmodium molliculum* y el indicador Gravidéz. También se grafica que no se observó una relación entre el aumento de la dosis del extracto investigado y el indicador Gravidéz.

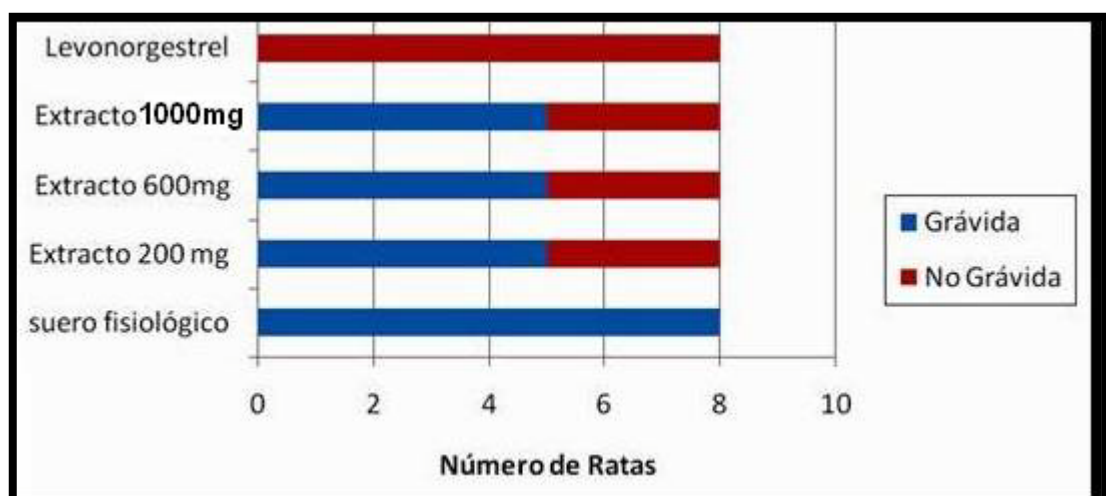


Figura 3. Asociación entre Actividad Postcoital y Gravidéz en Ratas Holtzmann

En la Figura 4 se observa, de manera descriptiva, el efecto Postcoital del extracto de *Desmodium molliculum* y los indicadores microscópicos: número de implantaciones, número de fetos vivos y número de fetos muertos. Se observa que a pesar de la variación entre los indicadores nombrados, se tiene que el extracto de *Desmodium molliculum* disminuyó el número de implantaciones aunque esta no fue estadísticamente significativo en relación al subgrupo suero fisiológico ($p < 0,05$) (ver anexo 2, tablas 5 y 6); también se observó que el extracto de *Desmodium molliculum* disminuyó el número de fetos vivos, hallazgo que fue estadísticamente significativo para todos los subgrupos extracto en relación al subgrupo suero fisiológico, mientras que los resultados entre el subgrupo levonorgestrel y los subgrupos extracto 200mg/kg y 600mg/kg presentaron diferencias estadísticamente significativas, en tanto que no hubo diferencia estadística significativa entre los resultados para los subgrupos levonorgestrel y extracto 1000mg/kg ($p < 0,05$) (ver anexo 2, Tablas 7 y 8). En relación, al tercer indicador se encontró un aumento el número de fetos muertos en todos los subgrupos extracto en comparación al subgrupo suero fisiológico y en relación al aumento de la dosis del extracto, aunque este hallazgo fue sólo estadísticamente significativo entre los subgrupos extracto 1000mg/kg y levonorgestrel.

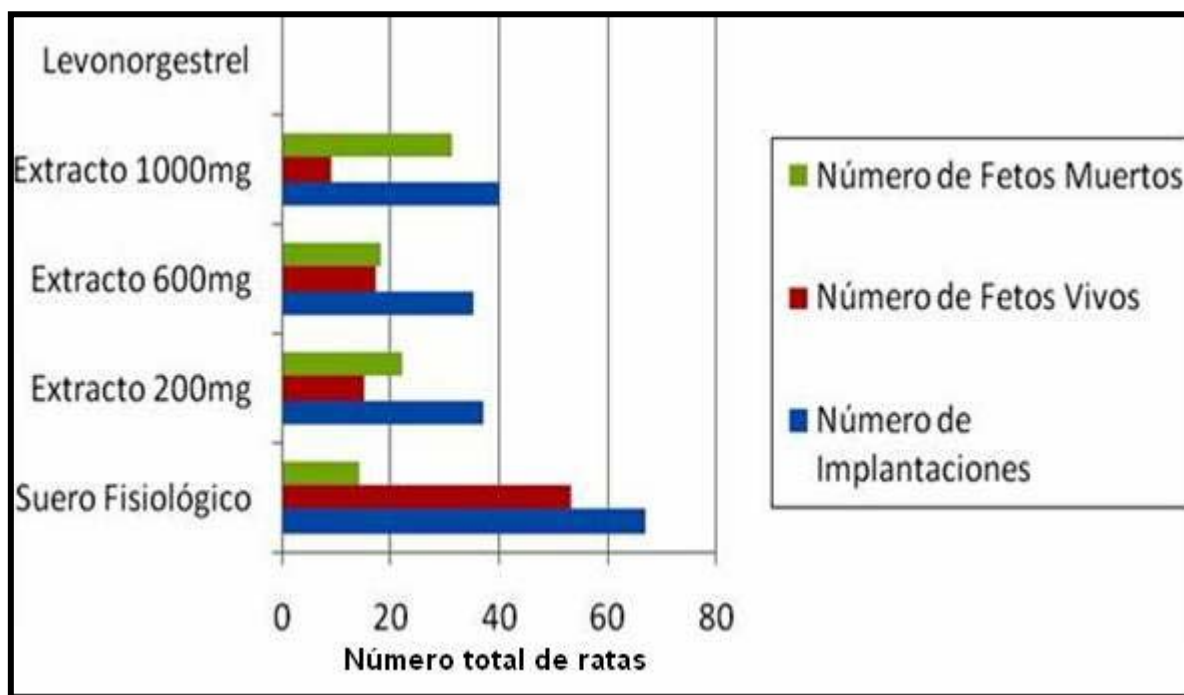


Figura 4. Efecto Postcoital según Indicadores Microscópicos

En cuanto a los indicadores microscópicos, en la Figura 5 se observa, de manera descriptiva, el efecto Postcoital del extracto de *Desmodium molliculum* y el indicador número de implantaciones, en donde se observa que el extracto de *Desmodium molliculum* disminuyó el número de implantaciones, aunque este hallazgo no fue estadísticamente significativo en relación al subgrupo suero fisiológico ($p < 0,05$). Asimismo, no se encontró diferencia estadística significativa entre los subgrupos extracto. (ver anexo 2, Tablas 5 y 6).

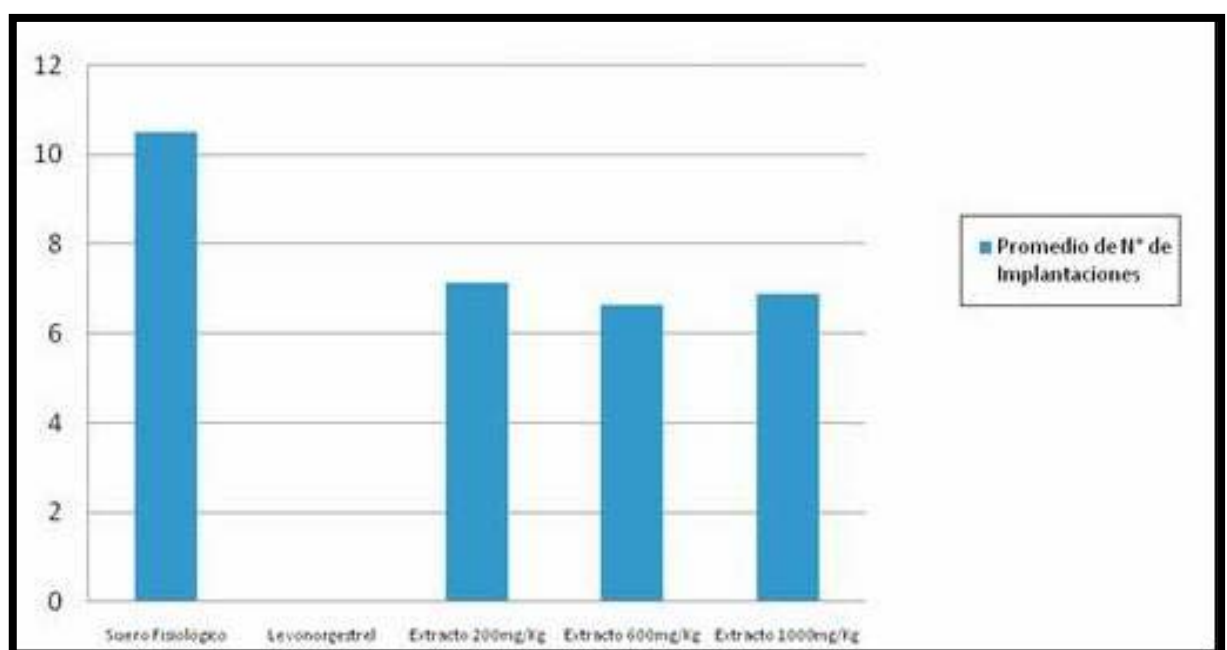


Figura 5. Efecto Postcoital del Extracto Etanólico de *Desmodium molliculum* (HBK) DC. “Manayupa” en ratas hembras Holtzmann

En la Figura 6 se observa que el extracto de *Desmodium molliculum* disminuyó el número de fetos vivos, hallazgo que fue estadísticamente significativo para todos los subgrupos extracto en relación al subgrupo suero fisiológico, así como entre los subgrupos 200mg/kg y 600mg/kg con el subgrupo levonorgestrel, en tanto que no hubo diferencia estadística significativa entre los resultados para los subgrupos levonorgestrel y extracto 1000mg/kg ($p < 0,05$). Asimismo, no se encontró diferencia estadística significativa entre los subgrupos extracto. (ver anexo 2, Tablas 7 y 8).

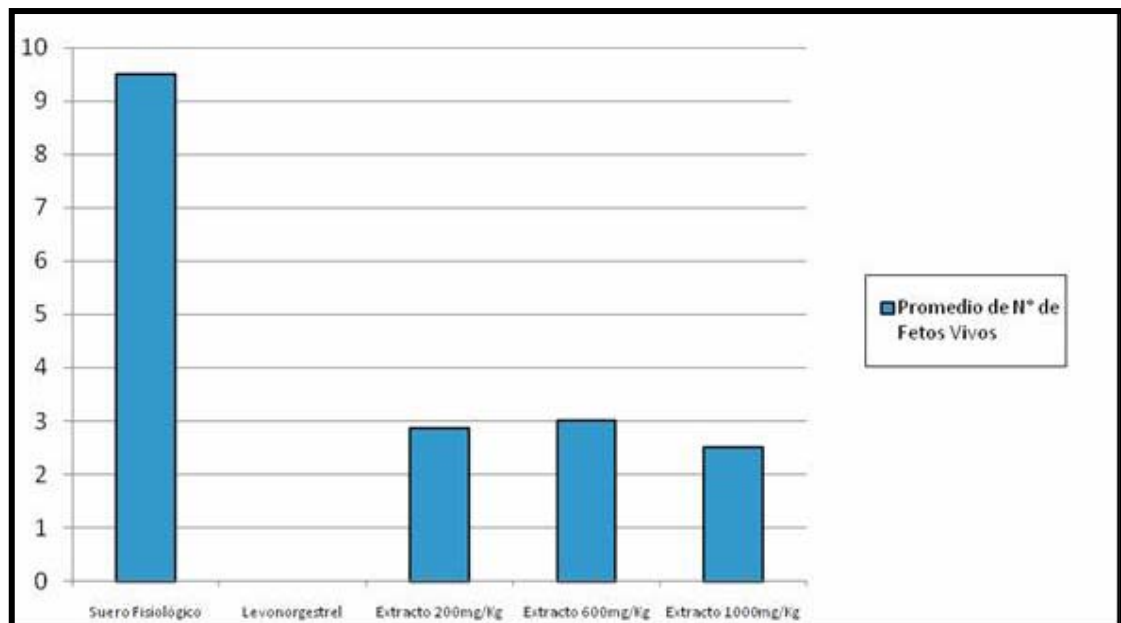


Figura 6. Efecto Postcoital del Extracto Etanólico de *Desmodium molliculum* (HBK) DC. “Manayupa” en ratas hembras adultas Holtzmann

En relación, al indicador número de fetos muertos, en la Figura 7 se observa que en los subgrupos extracto de *Desmodium molliculum* un mayor número de fetos muertos en comparación a los subgrupos suero fisiológico y levonorgestrel, siendo estos hallazgos estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Asimismo, no se encontró diferencia estadística significativa entre los subgrupos extracto. (ver anexo 2, Tablas 9 y 10).

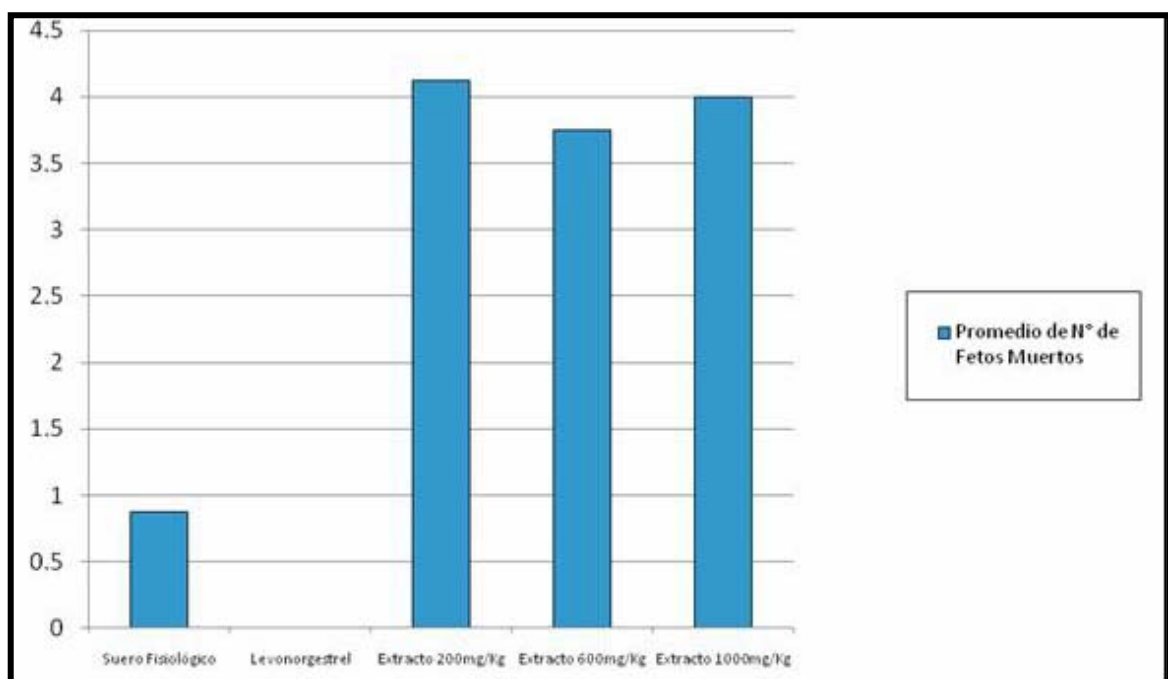


Figura 7. Efecto Postcoital del Extracto Etanólico de *Desmodium molliculum* (HBK) DC. “Manaypa” en ratas hembras adultas Holtzmann

4.4. Estudio Anatomopatológico:

4.3.1. Análisis Macroscópico:

El análisis de las muestras de tejidos tomados de los úteros de las ratas hembras fue macroscópico (común a todas las muestras enviadas) y microscópica variable según la muestra, fueron evaluadas por el Dr. Ernesto Raez Gonzáles, Médico Cirujano, especialidad Patólogo Clínico, del Instituto de Patología del Hospital Nacional Arzobispo Loayza.

Los análisis macroscópicos de las muestras, comunes a todas las muestras uterinas se observa con signos inflamatorios, edematizadas, hipertrofiados y presencia de lesiones de buena adherencia, color y dimensiones. Las muestras examinadas fueron uniformes de aproximadamente 3 x 2 x 2 mm de volumen, depositados en envase de vidrio debidamente sellados inmersos en una solución de formol al 10% tamponados para la evaluación histológica (Figuras 8 al 14).

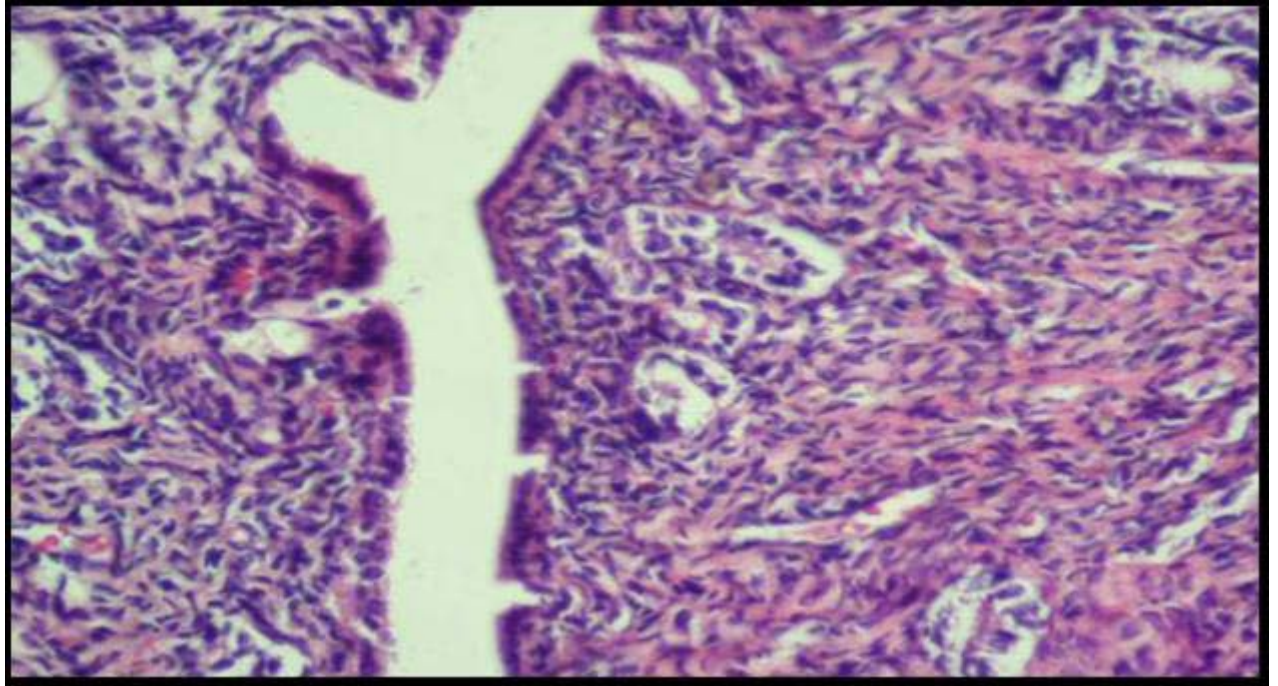


Figura 8: Corte Histológico del Útero de rata subgrupo, suero fisiológico. 5ml/kg. Útero no grávido endometrio uniforme y glándulas en fase proliferativa (Coloración H.E. Aumento 200x) n = 8

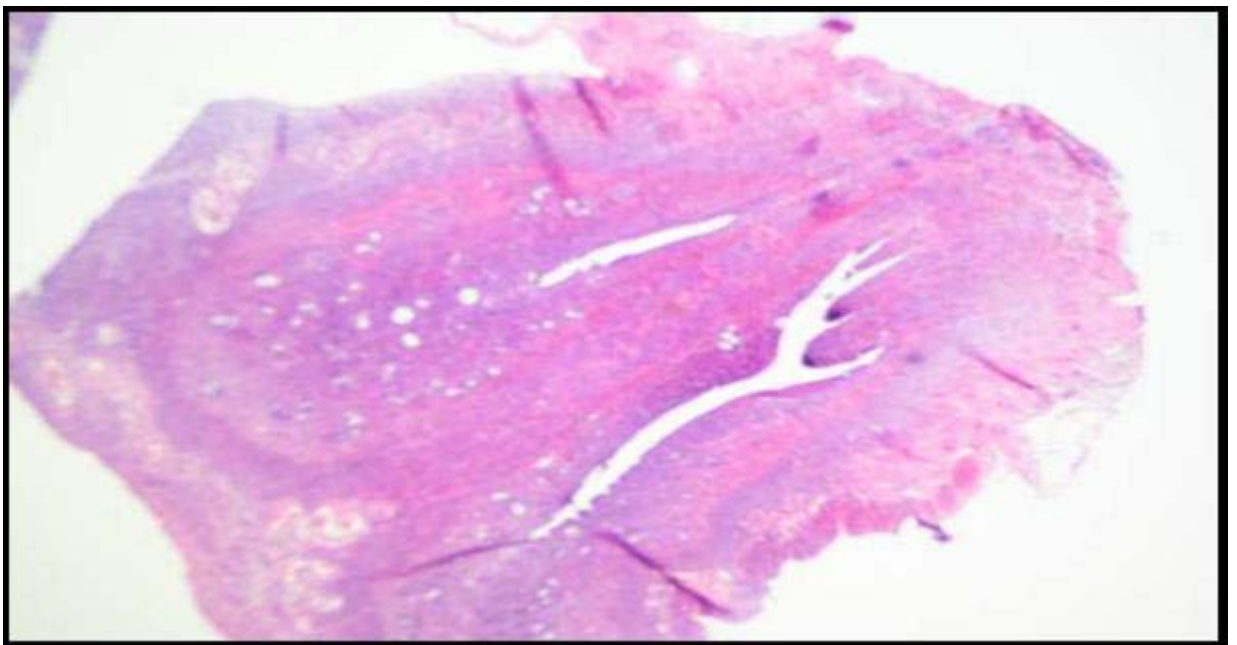


Figura 9: Corte Histológico del Útero de rata tratado con extracto de *Desmodium molliculum* 200 mg/kg. Anticoncepción. Hiperplasia endometrial y formación decidual. (Coloración H.E. Aumento 200x) n = 8

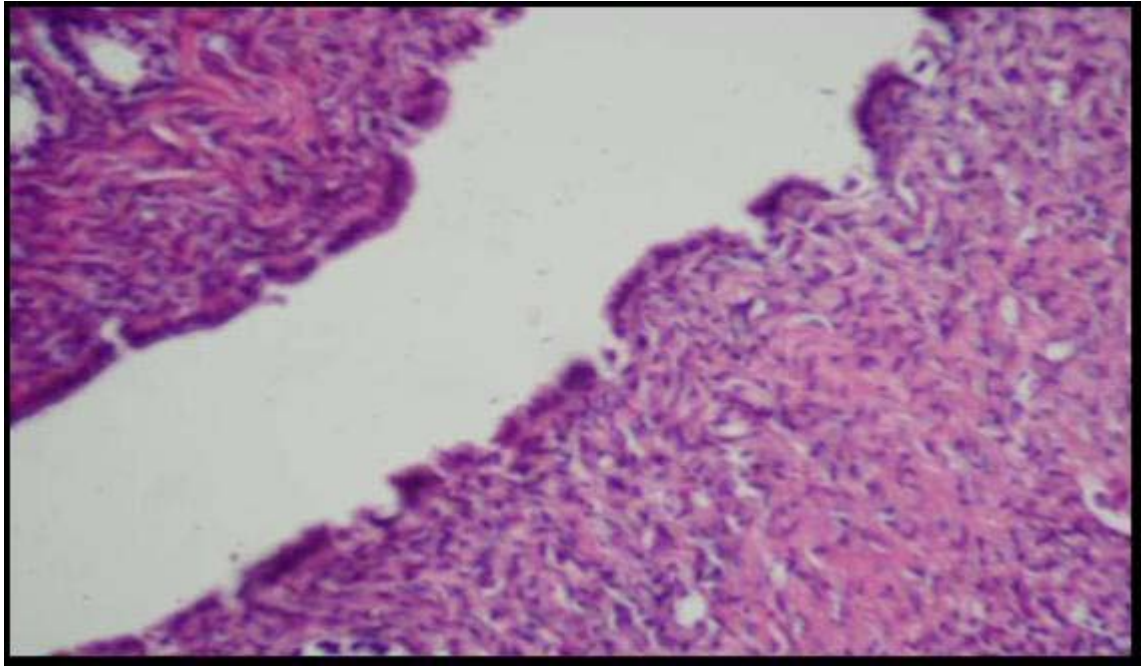


Figura 10: Corte Histológico del Útero de rata tratado con extracto de *Desmodium molliculum* 600mg/kg. Anticoncepción. Lumen uterino ligeramente distendido, supresión de glándulas endometriales. No grávido (Coloración H.E. Aumento 200x) n = 8

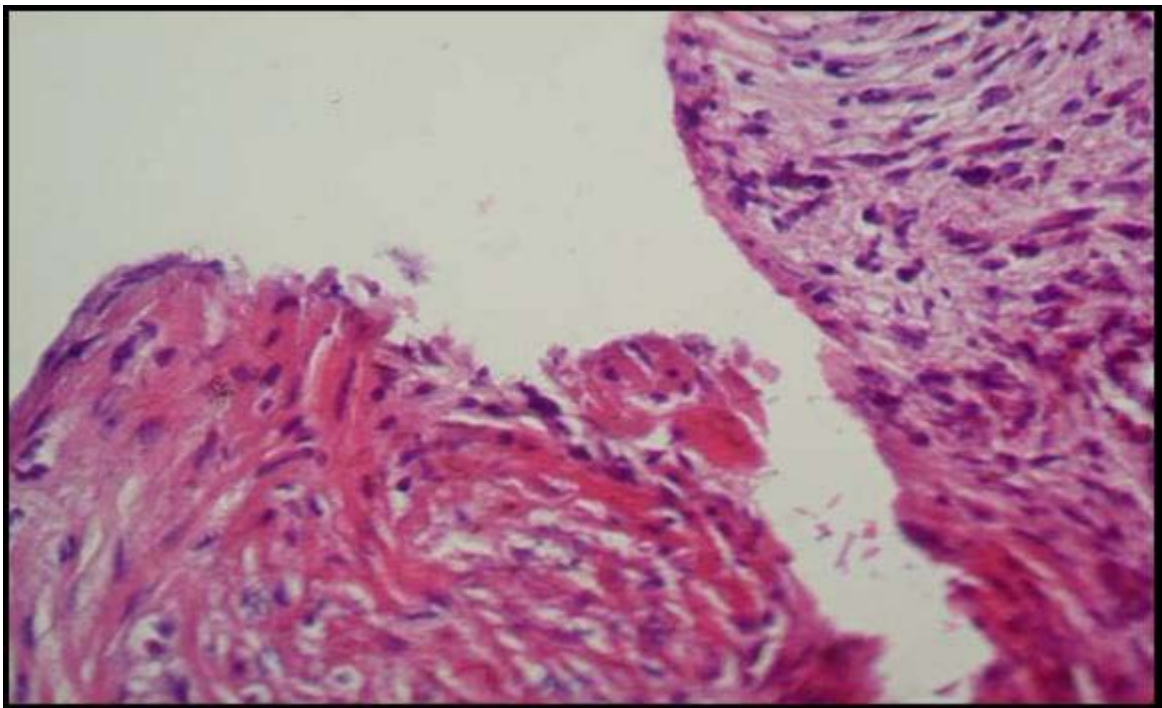


Figura 11: Corte Histológico del Útero de rata tratado con extracto de *Desmodium molliculum* 1 gr/kg. Anticoncepción. Signo de alteración en la estructura endometrial alta pérdida de Lumen endometrial Útero grávido descamado, No gestante (Coloración H.E. Aumento 200x) n = 8

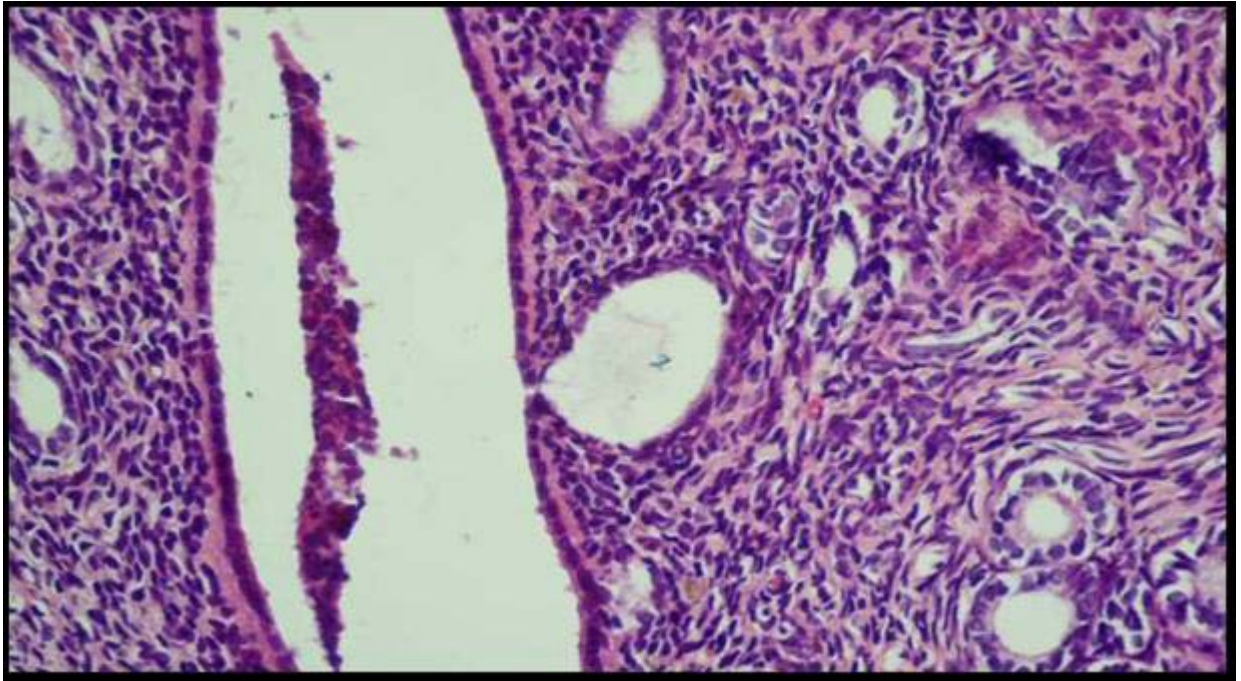


Figura 12: Corte Histológico del Útero de rata tratado con medroxiprogesterona 15 mg/kg. Anticoncepción. Se observa hiperplasia endometrial glandular, abundantes áreas quísticas. No grávido (Coloración H.E. Aumento 200x) n = 8

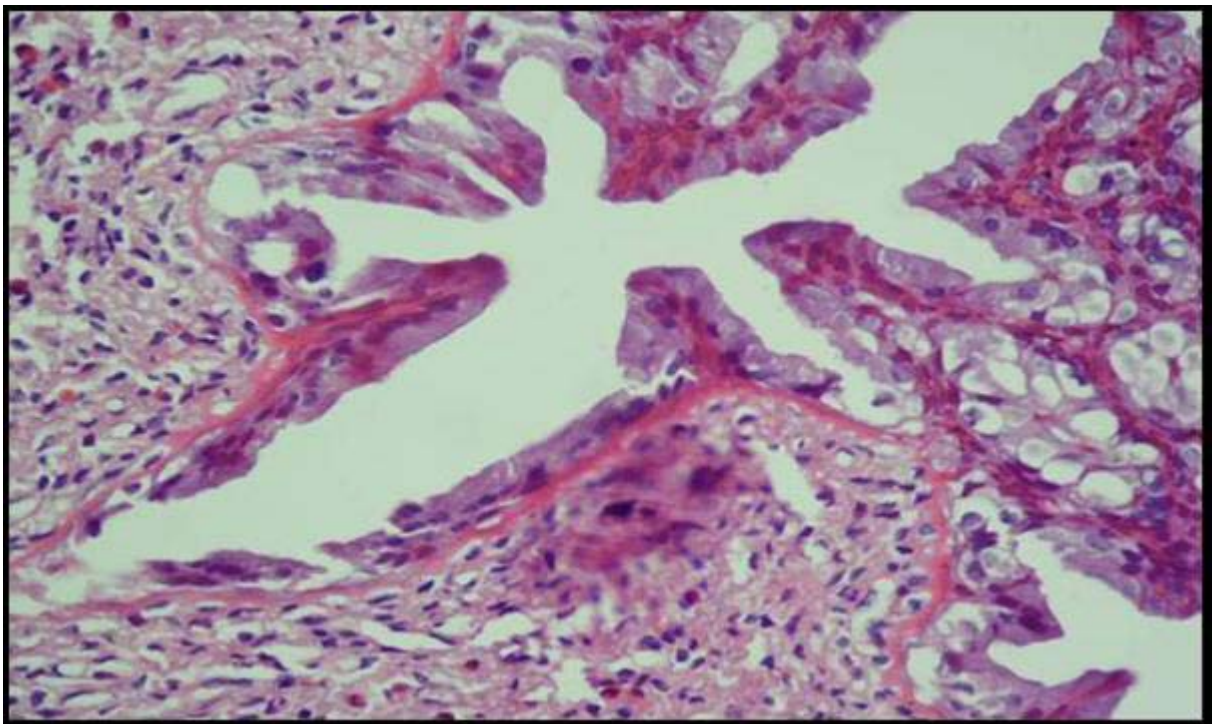
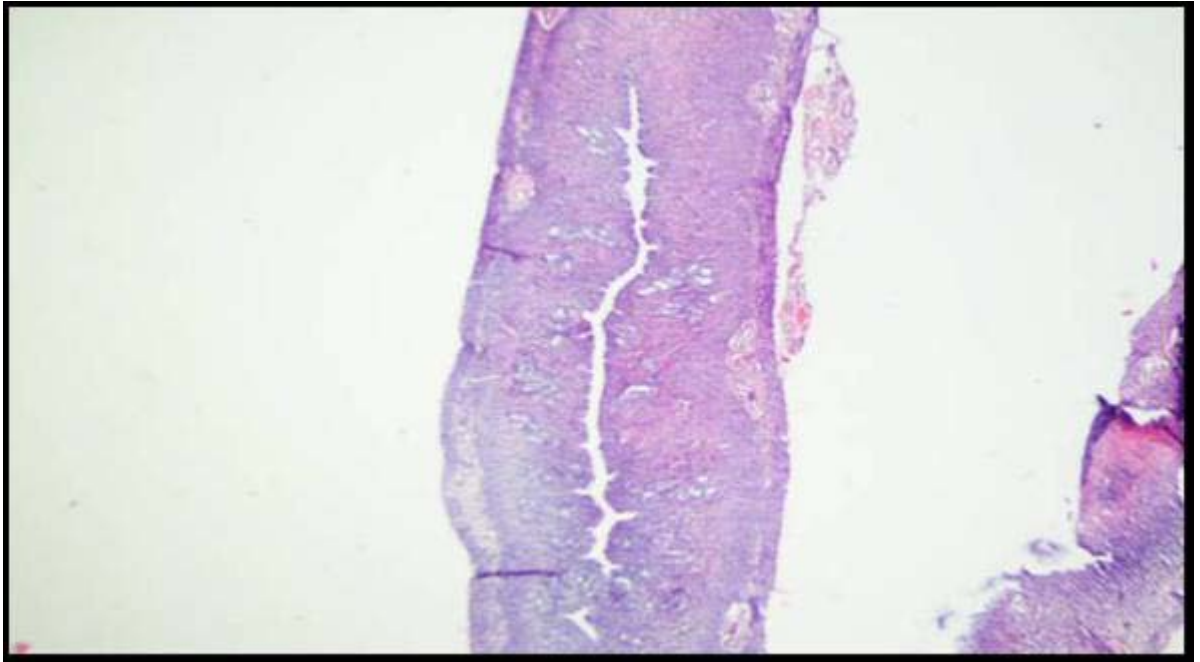


Figura 13: Corte Histológico del Utero de rata tratada con extracto de *Desmodium molliculum* 200mg/Kg Postcoital. Utero grávido, endometrio empastado e hiperplásico (Coloración H.E. Aumento 200x) n = 8



**Figura 14: Corte Histológico del Útero de rata tratado con extracto de *Desmodium molliculum* 1 gr/kg. Post coital. Útero No grávido
uniformidad endometrial, hiperplásico
(Coloración H.E. Aumento 200x) n = 8**



**Figura 15: Corte Histológico del Útero de rata tratado con levonogestrel
útero 50 ug/kg. Post coital. Aumento del engrosamiento endometrial
ruptura uterina
(Coloración H.E. Aumento 100x) n = 8**

V. Discusión

En el presente estudio se realizó la experimentación para determinar los efectos contraceptivos del extracto de hojas de *Desmodium molliculum* (HBK) DC (Manayupa), para evaluar su actividad anticonceptiva y post-coital al ser administrado por vía oral en dosis de 200mg/kg, 600mg/kg y 1000 mg/kg, de peso corporal en ratas hembras Holtzmann. Luego de realizada la experimentación no se observó efectos tóxicos mediante el examen visual en los grupos experimentales. Y esto concuerda con los estudios de toxicidad realizados por Bonilla et al. ⁽¹¹⁾ en *Artemia Salina* leach, los resultados indican que los extractos de *Desmodium molliculum* (HBK) D.C., más activos fueron las soluciones metanólicas, seguidos por los extractos acuosos obtenidos por cocimiento.

En esta investigación se utilizó el extracto etanólico de la planta debido a que esté preparado asegura una mayor actividad, como lo describe Bonilla et al. ⁽¹¹⁾ y cuyos resultados indican que los extractos de *Desmodium molliculum* (HBK) D.C. más activos fueron las soluciones alcohólicas, seguidos por los extractos acuosos obtenidos por cocimiento. Los resultados de esta investigación mostraron que el extracto utilizado posee efectos anticonceptivos y postcoitales (ver Figuras 1 y 3), y en cuanto al mecanismo de acción de estos efectos se ha descrito una relación con sus componentes fitoestrogénicos activos. Según la tabla fitoquímica preliminar del extracto (ver Anexo 3 tabla 1), se observa que el extracto utilizado en este estudio contiene importante presencia de alcaloides, taninos, esteroides, flavonoides, saponinas, compuestos fenólicos y carbohidratos.

Se han realizado investigaciones para determinar los principios activos responsables del efecto contraceptivo. Uno de ellos ha relacionado la importancia de la familia leguminosae como fuente natural de fitoestrógenos en particular de isoflavonas, genisteína y daidzeína ⁽⁶⁵⁾. Específicamente en cuanto a los componentes activos que posee el *Desmodium molliculum*, estudios experimentales demostraron que los extractos alcohólicos de *Desmodium molliculum* (HBK) presentan aminoácidos, compuestos fenólicos esteroides, triterpenoides, grupo fenólico, flavonoides y leucoantocianidinas ⁽¹¹⁾. Y en función de relacionar las características descritas responsables de la propiedad

contraceptiva del género *Desmodium*, y la presencia en el *Desmodium molliculum*.

Los resultados mostraron que el extracto utilizado posee efectos anticonceptivos, antiimplantación, debido a que las ratas hembras pretratadas dejadas con machos fértiles fueron protegidos de la concepción por 4 periodos gestacionales (Figura 1). Es un hecho bien conocido que para la implantación y el mantenimiento del embarazo, el equilibrio exacto de la secreción de estrógenos y progesteronas es importante. Cualquier desequilibrio en los niveles de estas hormonas puede causar antiimplantación o pueden inducir aborto. Muchos extractos de plantas con efecto antifertilidad presentan actividad estrogénica en ratas. En ratones y en humanos, los estrógenos son importantes en la implantación, ya que ellos participan en el balance estrógeno/progesterona y por esto en la receptividad uterina al embrión (⁷⁹⁻⁸⁰).

La importancia de la familia leguminosae como fuente natural de fitoestrógenos en particular de isoflavonas, genisteína y daidzeína (⁸¹) dieron inicio al estudio hormonal y de citotoxicidad a partir de los extractos de las plantas de la familia leguminosae, los cuales fueron seleccionadas por su actividad estrogénica con el sistema de las células de Ishikawa. De las plantas de prueba se incluyeron al *Desmodium oxyphyllum* destacando que fueron muy estrogénica de Concentración Efectiva Media (EC₅₀ valores menos de 10 microg/ml).

Según la tabla N° 1 fitoquímico preliminar del extracto (Anexo 3), mostró que contiene presencia importante de alcaloides, taninos, esteroides, flavonoides, saponinas, compuestos fenólicos y carbohidratos. Los aminoácidos estuvieron ausentes. (Falodun et al. 2001) (⁸²) informó los efectos oxitócicos de una planta que tienen saponinas, glucósidos, esteroides, taninos y alcaloides que actuaron en úteros aislados de ratas hembras, traen como consecuencia influencias negativas sobre el ciclo estral ya que reduce el número de días/ovulación durante el proestro y estro. La mayoría de estos compuestos están presentes en *Desmodium molliculum*.

Una notable diversidad de compuestos naturales y sintéticos se ha demostrado que imitan los efectos biológicos de la 17 beta estradiol en virtud a su capacidad

para activar a los receptores estrogénicos nucleares. Esto se extiende a la familia de los estrógenos no esteroideos incluyendo varios hidroxilados de chalconas, flavononas y flavonas. Estas hormonas de origen vegetal se indican que tienen la capacidad para estimular receptores dependientes de la respuesta transcripcional y para promover el crecimiento de estrógenos-dependientes. La respuesta transcripcional puede ser inhibido por el antagonista de los estrógenos esteroideos y es específico para el receptor estrogénico. Se presentan evidencias para demostrar que los compuestos hidroxilados de flavonoides específicos interactúan directamente con el receptor de estrógenos. Estos compuestos son menos activos en comparación con los estrógenos sintéticos, pero tienen potencias comparables con otros fitoestrógenos ⁽⁵⁰⁾. En otro estudio se ha reportado actividad antifertilidad en las semillas de *Vitex negundo* y efecto estrogénico debido a la presencia de la flavona: 5,7,3'-trihidroxi-6,8,4'-trimetoxi flavona en ratones.⁽¹⁵⁾

En los resultados de este estudio se observó que el subgrupo de levonorgestrel tuvo un marcado efectos en los indicadores analizados, número de implantaciones y número de fetos (Ver Figuras 4,5 y 6)- En cuanto a el efecto del levonogestre(LNG), el cual se utilizó como grupo referencia, Croxatto et al.,2004 ⁽⁸³⁾ expusieron a ratas hembras a dosis elevadas de levonorgestrel en varias etapas del ciclo reproductivo antes o después de la ovulación o antes o después del apareamiento. Los investigadores encontraron que el levonorgestrel inhibió total o parcialmente la ovulación, dependiendo del momento en que fue administrado así como de su dosis. Sin embargo, el fármaco no tuvo ningún efecto en la fecundación o implantación cuando se administró antes o después del apareamiento o antes de la implantación. (Palomino et al.,2003) ⁽⁸⁴⁾, indicaron en condiciones que el levonorgestrel administrado por vía oral, no altera el proceso ovulatorio, no impide la síntesis de progesteronas por el cuerpo luteo. El LNG no modifica el patrón de expresión de los receptores de progesterona durante el proceso de la implantación.

Los efectos del extracto de etanol *Desmodium molliculum* en el ciclo estrogénico de la rata hembra en el presente estudio no manifestaron una relación dosis-dependiente, este hecho probablemente haya ocurrido debido a que las dosis

mínima utilizada fue suficiente para producir los efectos, por lo cual se tendría en el futuro que hacer un estudio con menores dosis.

Los efectos del extracto metanólico *Aspilla africana* en el ciclo estrogénico de la rata hembra se pone de manifiesto una relación dosis-dependiente ya que esto reduce el número de días/ovulos, esta razón podría ser debido a la presencia de fitoestrógenos como saponinas y aceites esenciales, el efecto inhibidor de esteroides y saponinas en el ciclo estrual se ha reportado de Tamura et al ⁽⁸⁵⁾. Se ha comprobado para reducir la fertilidad de los animales la administración debe ser continua. Las plantas fitoestrogénicos tienen efectos estrogénica como antiestrogénica sobre los sistemas de los mamíferos, así se impide las implantaciones en el sistema reproductivo, la disminución de los niveles de los esteroides ováricos inducidas por las saponinas puede ser debido a su acción inhibidora sobre la expresión génica de la enzima esteroide citocromo p-450, y sobre la proliferación de las células granulosas del ovario (Anexo 4, Gráfico 1 y 2) ^(86,87)

El extracto ha demostrado ser muy significativa la actividad antiimplantación cuando se administró a partir del día 1 al 7. El extracto fue dado durante diferentes períodos de gestación en las etapas sucesivas de la embriogénesis ⁽⁸⁸⁾. A partir de nuestros resultados es evidente que el extracto inhibe la implantación cuando se administra en la fase cigótica (días 1-3) y en la etapa del blastocisto de 3 a 5 días. Muchos extractos de plantas antifértiles se saben que presentan actividad estrogénica en ratas, los estrógenos provocan aumento de la síntesis de proteínas, peso uterino, retención de líquidos en la cavidad uterina. Además los estrógenos inducen cambios uterotrópicos, tales como aumento del diámetro del utero, grosor del endometrio proporcionando condiciones no receptivas para su implantación. Los estrógenos causan apertura vaginal, que es una medida cualitativa ⁽⁷⁹⁻⁸⁰⁾ (Anexo 4, Gráfico 3). ⁽⁸⁹⁾

Figuras del 9 al 11, muestran úteros de ratas tratadas con diferentes dosis del extracto *Desmodium molliculum*, así mismo la figura 12 (Medroxiprogesterona a dosis 15mg/kg) Cuando se compara con la figura 8, se mostró a dosis dependiente supresión y degeneración del endometrio, estroma endometrial y engrosamiento de los vasos sanguíneos del endometrio. Estos efectos son

indicativos de la potencia anticonceptiva del *Desmodium molliculum*. Estos efectos son más probablemente debido a los desequilibrios en el nivel hormonal provocado por el elevado nivel de flavonoides, saponinas esteroidales, y otros fitoestrógenos. El grosor del endometrio varía considerablemente de acuerdo al estado hormonal del individuo (⁹⁰).

Figuras 13 y 14, muestran úteros de ratas tratadas con extracto de *Desmodium molliculum* a dosis 200mg/kg y 1gr/kg respectivamente se comparó con la figura 15 de levonorgestrel a dosis 50ug/kg., se muestra cambios endometriales hiperplásicos, glándulas dañadas, degeneración epitelial/necrosis, cuando se compara con la figura 14., es posible que el extracto de *Desmodium molliculum* pueda interferir con el proceso de fertilización en el oviducto (Pre-implantación) de los úteros o un deterioro en la producción de citoquinas, factores de crecimiento y distintos tipos de molécula de adhesión, ya sea por el blastocito en desarrollo o del epitelio uterino en todo el sitio de implantación (^{91,92}).

En vista de los resultados anticonceptivos y contraceptivo postcoital del extracto de *Desmodium molliculum* en ratas Holtzmann, se recomienda realizar estudios de seguridad reproductiva en animales de experimentación, evaluar el efecto en ratas ovariectomizadas, formular un fitomedicamento y validar estos efectos a diferentes concentraciones

VI. CONCLUSIONES:

1. Se ha demostrado que el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* al ser administrado por vía oral presenta efecto anticonceptivo y contraceptivo postcoital en ratas hembras Cepa Holtzmann, y no fue dependiente de la dosis.
2. El efecto anticonceptivo y poscoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* probablemente se deba principalmente a la acción de los flavonoides con actividad estrogénicas y no estrogénicas a nivel uterino, presentes en el extracto utilizado.
3. Las observaciones histopatológicas de los úteros de ratas tratadas con diferentes niveles de dosificación del extracto *Desmodium molliculum*, han evidenciado cambios morfológicos como engrosamiento, supresión a nivel del estroma endometrial, indicando alteraciones en la reproducción.

VII. Referencias bibliográficas:

- 1 Maurya R, Srivastava S, Kulshreshta DK, Gupta CM. Traditional remedies for fertility regulation. *Curr Med Chemistry* 2004; 11: 1431-1450.
- 2 Unny R, Chauhan AK, Joshi YC, Dobhal MP, Gupta RS. A review on potentiality of medicinal plants as the source of new contraceptive principles. *Phytomedicine*. 2003; 10: 233-260.
- 3 Kong YC, Xie JX, But PP. Fertility regulating agents from traditional Chinese medicines. *J Ethnopharmacology* 1986; 15(1): 1-44.
- 4 Mc Neil RT, Noronha CC, Kusemiju TO, Okanlawon AO. The antioviulatory effects of *Ricinus communis* Linn. *Nig J Health Biomed*. 2003; 2(1): 31-34.
- 5 Brack A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles en el Perú. 1^{ra} Ed. Centro de estudios regionales andinos San Bartolomé de las Casas. Lima. 1999. p. 179.
- 6 Herrera L. Contribución al estudio florístico de la provincia de concepción, (Junín): Dicotiledóneas. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNMSM. 2002. p. 79.
- 7 Hammond GB, Fernandez ID, Villegas LF, Vaisberg AJ. A survey of traditional medicinal plants from the callejon de huaylas, department of ancash, Perú. *J of Ethnopharmacology*. 1998; 61: 17-30
- 8 De Feo V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian andes. *Fitoterapia*. 1991; 63(3): 426-427.
- 9 Ghosal R, Banerjee S, Bhattacharya S, Sanyal A. Chemical and pharmacological evaluation of *Desmodium puchellum*. *Plant Med*. 1972; 21(4): 398-409.
- 10 Ghosal R, Mazunder U, Mehta R. Indole bases of *Desmodium gyrans*. *Phytochemistry*. 1972; 11: 1863-1864.
- 11 Bonilla P, Lozano N, Arroyo J, Arias G, Cordova A, Baldoceda F. Evaluación Fitoquímica y actividad biológica de *Desmodium molliculum* (HBK) DC."Manayupa". *Ciencia e Investigación* 2001;4(2): 37-44.

- 12 Vasquez MR. Useful plants of Amazonian Peru. Spanish typescript second draft. Filed with USDAS National Agricultural Library. 1990.p.134.
- 13 Guarin NG. Plantas medicinais do estado do mato grosso. Associacao brasileira de educacao agrícola superior. 1996 p. 31.
- 14 D'Agostino M, Pizza C, De Simone F. Flavone and flavonol glycosides from *Desmodium molliculum*. Fitoterapia. 1995; 66: 384-385.
- 15 Bhargava S. Estrogenic and pregnancy interruptory effects the flavonoids of *Vitex negundo* seeds in mice. Plant Med Phytother. 1984; 18: 74-79.
- 16 Sharangouda P, Sarascuati BP. Estrogenic activity of petroleum ether extract of seeds of *Citrus medica* on immature albino rats. International J of Green Pharmacy. 2008; 2: 91-94.
- 17 Okwuasaba FK, Osunkwo UA, Ekwonchi MM, Ekpenyong KI, Onwukeme KE, Olayinka AO et al. Anticonceptive and estrogenic effects of a seed extract of *Ricinus communis*. J Ethnopharmacol. 1991; 34(2-3): 141-5.
- 18 Pakrashi A, Basak B. Abortifacient effect of steroids from annas com and their analogues on mice. J Reprod Fert. 1976; 46(2): 461-462.
- 19 Ohashi M. Taxonomic studies in *Desmodium heterocarpon* (L) DC (fabaceae). J of Japanese Botany; 66(1): 14-25.
- 20 Ramos G, Molina C, Ferreira P, Chávez O. Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios bioactivos de *desmodium sp.* Manayupa. Inv. UNICA. 2000.
- 21 Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. The physiology of reproduction: Chapter 46. 2da Ed. Knobil E. Raven Press. Ltd. New York. 1994. p 613-660.
- 22 Rivest RW. Sexual maturation in female rats, hereditary, developmental and environmental aspects. Experientia. 1991; 47: 1026-1028.
- 23 Norris M, Adams C. Exteroceptive factors, sexual maturation and reproduction in female rat. Laboratory animals. 1979; 13: 283-286.
- 24 Griffith J, Farris E. The rat in laboratory investigation. JB Lippincott Co. USA. 1992.p. 50-55.
- 25 Zinder O, Hamosh M, Fleck J, Scow R. Effect of prolactin on lipoprotein lipase in mammary glands and adipose tissue of rats. Am J Physiol 1974; 226(3): 742-748.

- 26 Kato J, Onouchi T. Specific progesterone receptors in the hypothalamus and anterior hypophysis of the rat. *Endocrinology* 1977;101:920-928
- 27 Heape W. The sexual season of mammals and the relation of the pro-oestrus to menstruation. *Q J Micr Sci* 1900;44:1-70.
- 28 Long J, Evans H. The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. *Memoris University of California* 1922; 6:1-148.
- 29 Everett J. Neurobiology of reproduction in the female rat. A fifty-year perspective. *Monogr Endocrinol* 1989;32:1-133.
- 30 Tebar M, Ruiz A, Gaytan F, Sanchez-Criado JE. Follicular and luteal progesterone play different roles synchronizing pituitary and ovarian events in the 4-day cyclic rat. *Biology of reproduction* 1995;53:1183-1189
- 31 Hashimoto I, Wiest W. Luteotropic and luteolytic mechanism in rat corpora lutea. *Endocrinology* 1969; 84: 886-892
- 32 Kaneko S, Sato N, Sato K. Changes plasma progesterone, estradiol, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during diestrus and ovulation in rats with 5-day estrous cycles effect of antibody against progesterone. *Biol Reprod* 1986; 34:488-494.
- 33 Furudate S, Hashimoto I, Hosi T. Secretion of ovarian progestins in the 5-day cyclic rat. *Jpn J Anim Reprod* 1975;20: 144-145.
- 34 Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of the progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat prolactin, gonadotrophin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1974; 96: 219-226
- 35 Henrique Pinto, Cristina. O ciclo estral de rata e efeitos da castração e da terapia hormonal substitutiva
<http://137.222.110.150/calnet/Ovarian/page2.htm>. Fecha de acceso setiembre 2007
- 36 Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. . 3ra ed. Elsevier academic press. 2006(2) Chapter 43. Neuroendocrine controls of the ovarian cycle of the rat. p.2328-2386.
- 37 Espey LL. Evaluation of proteolytic activity in mammalian ovulation. The physiology of reproduction. 2da Ed. Knobil E, Neill JD. Raven press Ltd. New York. 1994; Chapter 13: 725-745.

- 38** Shoham Z, Schachler M. Estrogen biosynthesis-regulation, action, remote effects and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertility and Sterility* 1996; 65: 687-701.
- 39** Carson-Junca MA, Schrader WT, O Malley BW. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 1990; 11.:201-220.
- 40** De Jong FH. Inhibin. *Physiol Rev* 1988;68: 555-607.
- 41** Rivier C, Vale W. Immunoneutralization of endogenous inhibin modifies hormone secretion and ovulation rate in the rat. *Endocrinology* 1989;125: 152-157.
- 42** Arai K, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S. Roles of inhibin and estradiol in the regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone secretion during the estrous cycle of the rat. *Biology of Reproduction* 1996;55: 127-133.
- 43** Garriss DR, Billiar RB, Taboaka Y, White RS, Little B. In situ estradiol and progesterin (R5020) localization in the vascularity separated and isolated hypothalamus on the rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 1981; 32: 202-208.
- 44** Sanchez-Criado JE, Bellido C, Galiot F, López FJ, Gaytaán F. A possible mechanism of the anovulatory action of antiprogesterone RU486 in the rat. *Biology of reproduction* 1990; 42: 877-886.
- 45** Durand JD. Historical estimates of world population: An evaluation. *Pop Der Rev.* 1977; 3: 253-296.
- 46** Gómez-Sánchez PI. Historia de la planificación familiar. Planificación familiar: una visión integral. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina, departamento de Ginecología y Obstetricia. 1998.p.3-7.
- 47** Bruner CC. Natural contraception. *Adolescent Med Clinics.* 2005; 16(3): 603-616.
- 48** Goodman y Gilman. Bases farmacológicas de la terapéutica. 11va Ed. México. McGraw-Hill Interamericana. 2006. p. 1542-1543
- 49** Evans WC. Pharmacognosy. 15va Ed. Londres. WB Saunders Company Ltd. 2001. p. 247.
- 50** Mikscicek RJ. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol.* 1993; 44: 37-43.

- 51 Hiremat SP, Badami S, Hunasagatta SK, Patil SB. Antifertility and hormonal properties of flavones o *Striga oronbanchoidies*. Eur J Pharmacol 2000; 391(1-2): 193-197.
- 52 De Tommasi N, Piacente S, Pizza C. Flavonol and Chalcone ester glycosides from *Bidens andicola*. J Nat Prod 1998;61(8): 973-977.
- 53 Shivalingappa H, Satyanarayan ND, Purohit MG. Antiimplantation and pregnancy interruption efficacy of *Rivea hypocrateriformes* in the rat. J Ethnopharmacol 2001; 74(3): 245-249.
- 54 Kincl FA, Dorfman RI. Antifertility activity of various steroids in the female rat. J Reprod Fertil 1965;10:105-113.
- 55 Villavicencio O. La transdisplinaridad. Revista Salud Natural 1993;1(2): 45-46.
- 56 Brako L,Zarucchi JL. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monographin Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden USA 1993; p 1286.
- 57 Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants. New York,The New York Botanical Garden,1988.p 852.
- 58 Schultes RE, Raffut RF. The healing forest medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia. Porland Oregon Dioscorides Press 1990. p. 484.
- 59 Kvist L,Holmn-Nielsen LB. Ethnobotanical aspects low land Ecuador.Opera Botanica 1987;92:83-107.
- 60 Flores D, Villalobos E, Esteves R. Estudios preliminares del efecto del extracto alcohólico de *Desmodium adscendens* “Amor Seco” sobre la fecundidad en ratas hembras. Anales de la Facultad de Medicina UNMSM 2002;63:28-29.
- 61 Tourton J, Serrano G, Reategui UI, Alban J. “Plantas y arboles medicinales de los conibos del Alto Ucayali:Concepciones nativas y Botánica.Revista Forestal del Perú 1987;13(2): 107-130.
- 62 Caius JF. The medicinal and poisonous legumes of India. Scientific Publishera Inan 1989; p 44-45.
- 63 Jain SK. Dictionary of Indiana Folk Medicine and Ethnobotany. Deep Publications. Nueva Delhi India 1991.p. 72.

- 64 Dharmani P, Mishra PK, Maurya R, Chauhan VS, Palit G. *Desmodium gangeticum*: a potent anti-ulcer agent. Indian J. Exp Biol 2005;43(6):517-521.
- 65 Florez J. Farmacología Humana. Editorial Masson. España. 2003. p. 906.
- 66 Glasier AF. Emergency postcoital contraception. N Engl J Med 1997; 337: 1058-1064.
- 67 Organización Mundial de la Salud. Anticoncepción de emergencia. Ginebra: OMS; 1999.p.63.
- 68 Finger W. La anticoncepción después del acto sexual. Network en Español 2001; 21(1): 4-9
- 69 Kholkute S, Mudgal V, Desphande P. Screening of indigenous medicinal plants for antifertility potentiality. Plant Med. 1976; 29: 151-155.
- 70 Ramirez H. Anticoncepción oral de emergencia: una mirada científica. Sociedad peruana de obstetricia y ginecología. 2006-p.31.
- 71 Según CA. Psiquiatría folklórica, shamanes y curanderos. Ediciones Emanar. 1979. p. 36
- 72 Samuelson G, Kyermaten G, Farah M. Preliminary chemical characterization of pharmacologically active compounds in aqueous plant extracts. Journal of Ethnopharmacology. 1985;14: 193-201.
- 73 American college of obstetricians and gynecologists. Diagnosis and management of fetal death. Washington. ACOG Technical Bulletin. 1993; N^o 174
- 74 Sharp PE, The Laboratory Rat. USA. CRC Press. 1998. p.15-19.
- 75 Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica.Métodos en el estudio de productos naturales.2da ed. Lima Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú, 1994. p. 1-7
- 76 Nwafor PA,Okwuwasaba EK. Contraceptive and estrogenic effect of a methanol extract of Cassia nigricans leaves in experimental animals.Pharmaceutical Biology 2001, 39: 424-428.
- 77 Shirishailappa B,Aneesh R,Sankar S, Sathishkamar MN, Suresh B, Rajan S. Antifertility activity of Derris brevipes variety coriaceae.J Ethnopharmacol 2003, 84: 99-104
- 78 Müller AL, Lladós CM, Croxatto HB. Postcoital treatment with levonorgestrel does not disrupt postfertilization events in the rat. Contraception 2003;67: 415-419.

- 79 Rifal N, John J, Albers Paul SB. Fundamental of clinical chemistry, 5th ed Lipids, Lipoproteins and apolipoproteins. WB Saunders Company; Philadelphia, 2001, p 462-493.
- 80 Dhar SK, Antifertility activity and hormonal profile of Trans-Anethole in rats. Indian J Physiol Pharmacol 1995; 39:63-67.
- 81 Yoo HH, T, Ahn S, Kim HY, Piao XL, Park JH, Evaluation of the Estrogenic activity Of Leguminosae . Plants Biol 2005, 28(3): 538-540
- 82 Falodun, A , Nworgu Z A, Ikponmwonsa M O. Phytochemical Components of *Huntleya umbellata* (K. Schum) and Its Effect on Isolated Non-Pregnant Rat Uterus in Oestrus. J Pharm Sci. 2006, 19(3); 256-258
- 83 Croxatto H, Ortiz ME. Mecanismo de acción del Levonorgestrel en la anticoncepción de emergencia. Rev Chil Obstet Ginecol 2004; 69(2): 157-162
- 84 Palomino A, Boric A. Gabrer F, Espinoza A, Vega M, Devoto L. Efecto de Levonorgestrel como anticonceptivo de emergencia sobre receptores de progesterona, durante la ventana de implantación. Revista Cubana de Salud Pública 2003; 24 Suplemento N° 1:38
- 85 Tamura, K, Honda, H.; Mimaki, Y.; Sashida, Y. & Kogo , H. Inhibitory effect of new steroidal saponin, OSW-1, on ovarian functions in rats. Br. J. Pharmacol., 1997., 121 (8) : 1796-1802.
- 86 Brige, SJ Mc Ewen BS, Wise MW Serms and Women's Health. University School of Medicine Washington 2000. p.1.-15.
- 87 George GJ, Kolja P, Nilsson S. Kushner J. Differential. Ligand Activation Estrogen receptors ER Alfa and ERB at AP1 Sites. Science 1997,(277) N° 5331: 1508-1510
- 88 Hafez ES. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea y Febiger Philadelphia, USA, 1970. p. 462-493
- 89 Clarke R, Brunner N. Cross – Resistance and Molecular mechanisms in antiestrogen Resistance. Endocrine Related Cancer. 1995 (2):59-72
- 90 Sponitz U.M. The functional morphology of the human endometrium and deciduas. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 1992; 124: 1 – 99
- 91 Denker, HW. Implantation a cell biological paradox. J Exp Zool. 1993; 266: 541-558
- 92 Haimovici F, Anderson DJ. Cytokines and growth factor in implantation. Microsc. Res Tech 1993; 25: 201-207

ANEXO 1

8.1. Fichas de Registro de Datos

I. Actividad Anticonceptiva

Grupo 1: control 5ml/kg.

Grupo 2: Extracto 200 mg/kg

Grupo 3: Extracto 600 mg/kg

Grupo 4: Extracto 1000 mg/kg

Grupo 5: Medroxiprogesterona 15mg/kg

Grupo 1: Suero fisiológico a dosis de 5ml/kg.

Grupo 2: Extracto de *Desmodium molliculum* a dosis de 200mg/kg.

RATAS	PESO (Gr.)	DOSIFICACIÓN
Rata 1	150 gr.	0,3 ml.
Rata 2	190 gr.	0,38 ml.
Rata 3	180 gr.	0,36 ml.
Rata 4	175 gr.	0,35 ml.
Rata 5	180 gr.	0,36 ml.
Rata 6	160 gr.	0,32 ml.
Rata 7	180 gr.	0,36 ml.
Rata 8	160 gr.	0,32 ml.

Grupo 3: Extracto de *Desmodium molliculum* a dosis de 600mg/kg.

RATAS	PESO (Gr.)	DOSIFICACIÓN
Rata 1	175 gr.	1,05 ml
Rata 2	180 gr.	1,08 ml
Rata 3	180 gr.	1,08 ml
Rata 4	150 gr.	0,9 ml.
Rata 5	180 gr.	1,08 ml
Rata 6	160 gr.	0,96 ml
Rata 7	175 gr.	1,05 ml
Rata 8	200 gr.	1,20 ml

Grupo 4: Extracto de *Desmodium molliculum* a dosis 1gr/kg.

RATAS	PESO (Gr.)	DOSIFICACIÓN
Rata 1	210 gr.	2,1 ml.
Rata 2	170 gr.	1,7 ml.
Rata 3	205 gr.	2,05 ml.
Rata 4	160 gr.	1,6 ml.
Rata 5	180 gr.	1,8 ml.
Rata 6	160 gr.	1,6 ml.
Rata 7	175 gr.	1,75 ml.
Rata 8	160 gr.	1,60 ml.

Grupo 5: Medroxiprogesterona a dosis 15mg/kg.

RATAS	PESO (Gr.)	DOSIFICACIÓN
Rata 1	210 gr.	0,21 ml.
Rata 2	190 gr.	0,19 ml.
Rata 3	225 gr.	0,25 ml.
Rata 4	230 gr.	0,23 ml.
Rata 5	240 gr.	0,24 ml.
Rata 6	200 gr.	0,20 ml.
Rata 7	190 gr.	0,19 ml.
Rata 8	220 gr.	0,22 ml.

1.1. Registro de Resultados Macroscópico de la actividad anticonceptiva:

Indicador: preñez

Fármaco Extracto 200mg/kg			
Preñez	Si	No	Total
si	02	00	02
no	00	06	06
Total	00	06	08

Fármaco Extracto 600 mg/kg			
Preñez	si	No	Total
si	02	00	02
no	00	06	06
Total	02	06	08

Fármaco Extracto 1000 mg/kg			
Preñez	si	No	Total
si	02	00	02
no	00	06	06
	02	06	08

Fármaco Medroxiprogesterona			
Preñez	si	No	Total
si	00	00	00
no	00	08	08
Total	00	08	08

1.2. Registro de Resultados Microscópico de la actividad anticonceptiva:

Indicador: Número de implantaciones y número de fetos

Grupo 1:

Rata	Preñada	Nº Fetos	Nº Implantaciones
1	01	08	08
2	01	10	11
3	01	07	07
4	01	07	07
5	01	09	10
6	01	09	11
7	01	05	08
8	01	11	11

Grupo 2:

Rata	Preñada	Nº Fetos	Nº Implantaciones
1	00	00	00
2	00	00	00
3	01	08	08
4	00	00	00
5	00	00	00
6	00	00	00
7	01	09	09
8	00	00	00

Grupo 3:

Rata	Preñada	Nº Fetos	Nº Implantaciones
1	00	00	00
2	00	00	00
3	00	00	00
4	01	07	07
5	00	00	00
6	01	08	08
7	00	00	00
8	00	00	00

Grupo 4:

Rata	Preñada	Nº Fetos	Nº Implantaciones
1	01	07	10
2	00	00	00
3	00	00	00
4	00	00	00
5	01	07	09
6	00	00	00
7	00	00	00
8	00	00	00

Grupo 5:

Rata	Preñada	Nº Fetos	Nº Implantaciones
1	00	00	00
2	00	00	00
3	00	00	00
4	00	00	00
5	00	00	00
6	00	00	00
7	00	00	00
8	00	00	00

II. Actividad Post-coital

Grupo 1: control 5ml/kg.

Grupo 2: Extracto 200 mg/kg

Grupo 3: Extracto 600 mg/kg

Grupo 4: Extracto 1000 mg/kg

Grupo 5: Levonorgestrel 50ug/kg

Grupo 1: Suero fisiológico a dosis de 5ml/ kg.

Grupo 2: Extracto de *Desmodium molliculum* a dosis 200mg/kg.

RATAS	PESO (Gr.)	DOSIFICACIÓN
Rata 1	175 gr.	0,35 ml.
Rata 2	225 gr.	0,45 ml.
Rata 3	210 gr.	0,42 ml.
Rata 4	225 gr.	0,45 ml.
Rata 5	170 gr.	0,34 ml.
Rata 6	200 gr.	0,40 ml.
Rata 7	200 gr.	0,40 ml.
Rata 8	190 gr.	0,38 ml.

Grupo 3: Extracto de *Desmodium molliculum* a dosis 600mg/kg.

RATAS	PESO (Gr.)	DOSIFICACIÓN
Rata 1	195 gr.	1,17 ml.
Rata 2	173 gr.	1,05 ml.
Rata 3	205 gr.	1,23 ml.
Rata 4	160 gr.	0,96 ml.
Rata 5	195 gr.	1,170 ml.
Rata 6	200 gr.	1,20 ml.
Rata 7	205 gr.	1,23 ml.
Rata 8	250 gr.	1,50 ml.

Grupo 4: Extracto de *Desmodium molliculum* a dosis 1gr/kg.

RATAS	PESO (Gr.)	DOSIFICACIÓN
Rata 1	175 gr.	1,75 ml.
Rata 2	210 gr.	2,10 ml.
Rata 3	190 gr.	1,90 ml.
Rata 4	175 gr.	1,75 ml.
Rata 5	200 gr.	2,0 ml.
Rata 6	180 gr.	1,8 ml.
Rata 7	200 gr.	2,0 ml.
Rata 8	180 gr.	1,8 ml.

Grupo 5: Levonorgestrel a dosis 50ug/kg.

RATAS	PESO (Gr.)	DOSIFICACIÓN
Rata 1	200 gr.	0,66 ml.
Rata 2	210 gr.	0,7 ml.
Rata 3	210 gr.	0,7 ml.
Rata 4	190 gr.	0,63 ml.
Rata 5	225 gr.	0,75 ml.
Rata 6	190 gr.	0,63 ml.
Rata 7	200 gr.	0,66 ml.
Rata 8	220 gr.	0,73 ml.

2.2. Registro Resultados Microscópico de la Actividad Postcoital:

Indicador: Número de Fetos e Implantaciones:

Grupo 1:

Rata	Preñada	Nº Fetos vivos	Nº fetos muertos	Nº Implantaciones
1	01	08	03	11
2	01	08	02	10
3	01	09	02	11
4	01	10	00	10
5	01	11	00	11
6	01	10	00	10
7	01	09	00	10
8	01	11	00	11

Grupo 2:

Rata	Preñada	Nº Fetos vivos	Nº fetos muertos	Nº Implantaciones
1	01	05	06	11
2	00	00	00	00
3	00	00	00	00
4	01	04	06	12
5	01	04	07	12
6	00	00	00	00
7	01	05	07	12
8	00	00	00	00

Grupo 3:

Rata	Preñada	Nº Fetos vivos	Nº fetos muertos	Nº Implantaciones
1	00	00	00	00
2	01	05	05	10
3	01	05	06	11
4	00	00	00	00
5	00	00	00	00
6	01	04	06	11
7	01	03	07	10
8	01	06	06	12

Grupo 4:

Rata	Preñada	Nº Fetos vivos	Nº fetos muertos	Nº Implantaciones
1	01	04	07	11
2	01	04	06	11
3	00	00	00	00
4	01	05	06	11
5	00	00	00	00
6	01	03	06	10
7	01	05	05	12
8	00	00	00	00

Grupo 5:

Rata	Preñada	Nº Fetos vivos	Nº fetos muertos	Nº Implantaciones
1	00	00	00	00
2	00	00	00	00
3	00	00	00	00
4	00	00	00	00
5	00	00	00	00
6	00	00	00	00
7	00	00	00	00
8	00	00	00	00

ANEXO 2

8.2. Análisis Estadístico de los Resultados:

I. Número de Implantes Actividad Anticonceptiva:

Tabla Nº 1. Análisis estadístico con la Prueba ANOVA ($p < 0.05$) del Indicador número de implantes y la actividad anticonceptiva del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*

ANOVA	df	F	Sig.
Entre grupos	4	6.011	.001
Dentro de grupos	35		
Total	39		

Tabla Nº 2. Análisis estadístico con la Prueba Tukey ($p < 0.05$) del Indicador número de implantes y la actividad anticonceptiva del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*

(I) Grupo	(J) Grupo	Sig.
Suero Fisiológico	Extracto 200mg	.007
	Extracto 600mg	.007
	Extracto 1000mg	.004
	Medroxiprogesterona	.002
Extracto 200mg	Suero Fisiológico	.007
	Extracto 600mg	1.000
	Extracto 1000mg	1.000
	Medroxiprogesterona	.986
Extracto 600mg	Suero Fisiológico	.007
	Extracto 200mg	1.000
	Extracto 1000mg	1.000
	Medroxiprogesterona	.986
Extracto 1000mg	Suero Fisiológico	.004
	Extracto 200mg	1.000
	Extracto 600mg	1.000
	Medroxiprogesterona	.998
Medroxiprogesterona	Suero Fisiológico	.002
	Extracto 200mg	.986
	Extracto 600mg	.986
	Extracto 1000mg	.998

The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla Nº 3. Análisis estadístico con la Prueba **ANOVA (p<0.05)** del Indicador número de fetos y la actividad anticonceptiva del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*

	df	F	Sig.
Entre grupos	4	4.388	.006
Dentro de grupos	35		
Total	39		

Tabla Nº 4. Análisis de múltiples comparaciones por la prueba **Tukey (p<0.05)** del Indicador número de fetos y la actividad anticonceptiva del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*

(I) Grupo	(J) Grupo	Sig.
Suero Fisiológico	Extracto 200mg	.027
	Extracto 600mg	.027
	Extracto 1000mg	.027
	Medroxiprogesterona	.007
Extracto 200mg	Suero Fisiológico	.027
	Extracto 600mg	1.000
	Extracto 1000mg	1.000
	Medroxiprogesterona	.982
Extracto 600mg	Suero Fisiológico	.027
	Extracto 200mg	1.000
	Extracto 1000mg	1.000
	Medroxiprogesterona	.982
Extracto 1000mg	Suero Fisiológico	.027
	Extracto 200mg	1.000
	Extracto 600mg	1.000
	Medroxiprogesterona	.982
Medroxiprogesterona	Suero Fisiológico	.007
	Extracto 200mg	.982
	Extracto 600mg	.982
	Extracto 1000mg	.982

The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla Nº 5. Análisis estadístico con la Prueba **ANOVA (p<0.05)** del Indicador número de implantaciones y la actividad postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*

ANOVA	df	F	Sig.
Entre grupos	4	8.249	.000
Dentro de grupos	35		
Total	39		

Tabla Nº 6. Análisis estadístico con la Prueba **Tukey (p<0.05)** del Indicador número de implantaciones y la actividad postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*

(I) Grupo	(J) Grupo	Sig.
Suero Fisiológico	Extracto 200mg	.101
	Extracto 600mg	.070
	Extracto 1000mg	.169
	Levonorgestrel	.000
Extracto 200mg	Suero Fisiológico	.101
	Extracto 600mg	1.000
	Extracto 1000mg	.999
	Levonorgestrel	.026
Extracto 600mg	Suero Fisiológico	.070
	Extracto 200mg	1.000
	Extracto 1000mg	.993
	Levonorgestrel	.039
Extracto 1000mg	Suero Fisiológico	.169
	Extracto 200mg	.999
	Extracto 600mg	.993
	Levonorgestrel	.014
Levonorgestrel	Suero Fisiológico	.000
	Extracto 200mg	.026
	Extracto 600mg	.039
	Extracto 1000mg	.014

The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla Nº 7. Análisis estadístico con la Prueba **ANOVA (p<0.05)** del Indicador número de fetos vivos y la actividad postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*

	df	F	Sig.
Entre grupos	4	29.591	.000
Dentro de grupos	35		
Total	39		

Tabla Nº 8. Análisis estadístico con la Prueba **Tukey (p<0.05)** del Indicador número de fetos vivos y la actividad postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*.

(I) Grupo	(J) Grupo	Sig.
Suero Fisiológico	Extracto 200mg	.000
	Extracto 600mg	.000
	Extracto 1000mg	.000
	Levonorgestrel	.000
Extracto 200mg	Suero Fisiológico	.000
	Extracto 600mg	.995
	Extracto 1000mg	.784
	Levonorgestrel	.053
Extracto 600mg	Suero Fisiológico	.000
	Extracto 200mg	.995
	Extracto 1000mg	.556
	Levonorgestrel	.021
Extracto 1000mg	Suero Fisiológico	.000
	Extracto 200mg	.784
	Extracto 600mg	.556
	Levonorgestrel	.440
Levonorgestrel	Suero Fisiológico	.000
	Extracto 200mg	.053
	Extracto 600mg	.021
	Extracto 1000mg	.440

The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla Nº 9. Análisis estadístico con la Prueba **ANOVA** ($p < 0.05$) del Indicador número de fetos muertos y la actividad postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*

	df	F	Sig.
Entre grupos	4	3.967	.009
Dentro de grupos	35		
Total	39		

Tabla Nº 10. Análisis estadístico con la Prueba **Tukey** ($p < 0.05$) del Indicador número de fetos muertos y la actividad postcoital del extracto etanólico de *Desmodium molliculum*

(I) Grupo	(J) Grupo	Sig.
Suero Fisiológico	Extracto 200mg	.859
	Extracto 600mg	.987
	Extracto 1000mg	.243
	Levonorgestrel	.430
Extracto 200mg	Suero Fisiológico	.859
	Extracto 600mg	.987
	Extracto 1000mg	.799
	Levonorgestrel	.071
Extracto 600mg	Suero Fisiológico	.987
	Extracto 200mg	.987
	Extracto 1000mg	.504
	Levonorgestrel	.195
Extracto 1000mg	Suero Fisiológico	.243
	Extracto 200mg	.799
	Extracto 600mg	.504
	Levonorgestrel	.004
Levonorgestrel	Suero Fisiológico	.430
	Extracto 200mg	.071
	Extracto 600mg	.195
	Extracto 1000mg	.004

The mean difference is significant at the .05 level.

ANEXO 3

8.3 Estudio Fitoquímico del Extracto Etanólico de *Desmodium molliculum*

ESTUDIO FITOQUÍMICO

(Marcha fotoquímica)

REALIZADO: Mg. QF. JUANA CHÁVEZ FLORES. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES.

MUESTRA: Extracto Hidroalcohólico de hojas/1mL de Etanol (EtOH)

En la Tabla N° 1 y Fig. N° 1 y 2 (ultravioleta) se evidencia que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Desmodium molliculum* “Manayupa”, presenta en mayor concentración esteroides, taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas esferoidales y en menor concentración azúcares reductores y aminoácidos.

Tabla N° 1: MARCHA FITOQUÍMICA *Desmodium molliculum* “Manayupa”
(30mg extracto hidroalcohólico de hojas/1mL de EtOH)

Reactivo	Metabolitos primarios y secundarios	Resultado
AlCl ₃	Flavonoides	+++
FeCl ₃	Compuestos fenólicos	+++
Shinoda	Flavonoides	+++
Gelatina-sal 1%	Taninos	+++
Liebermann - Bouchard	Esteroides	+++
Salkowski	Esteroides	+++
Rosenheim	Esteroides	+++
Índice afrosimétrico	Saponinas esteroidales	+++
Dragendorff	Alcaloides	+++
Mayer	Alcaloides	+++
Popoff	Alcaloides	+++
Wagner	Alcaloides	+++
Fehling A,B	Azúcares reductores	-
Ninhidrina	Aminoácidos	-
Molish	Carbohidratos	+++

Leyenda: (-) No detectable, (++) Moderado, (+++) Abundante

FIGURA 1

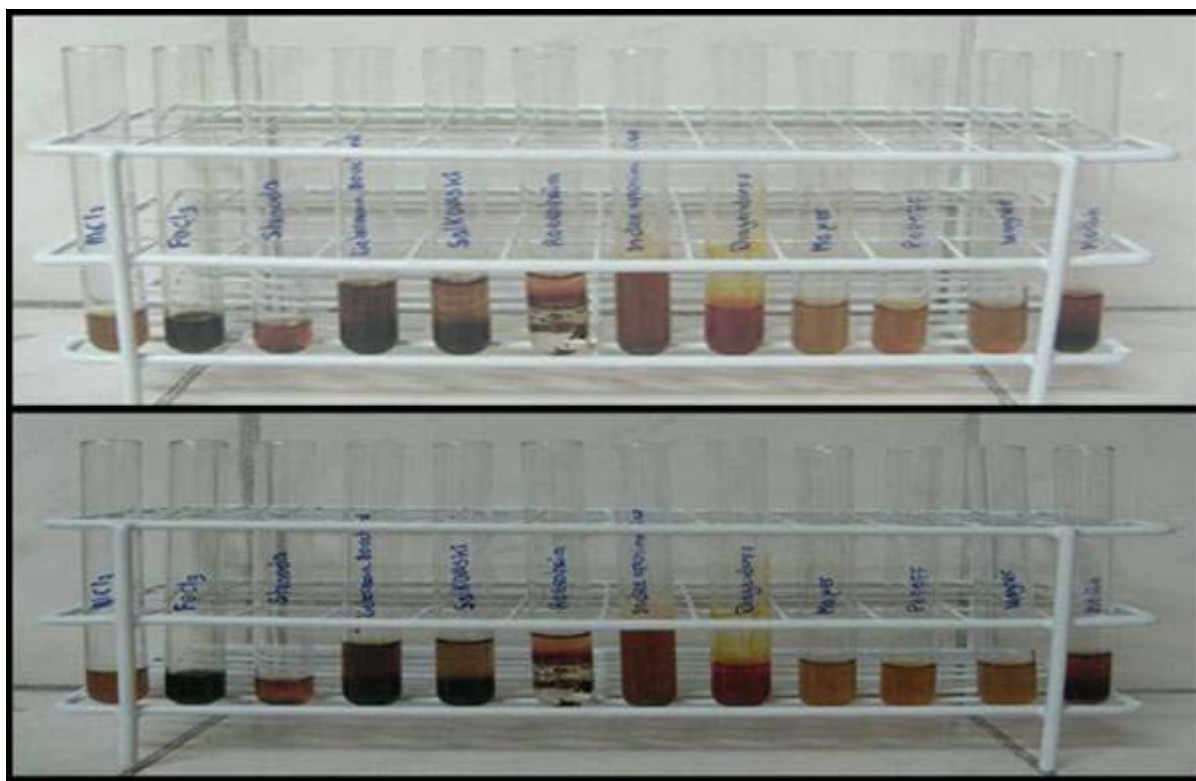
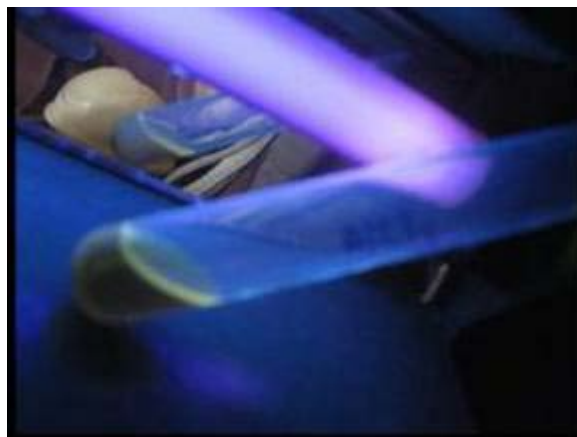
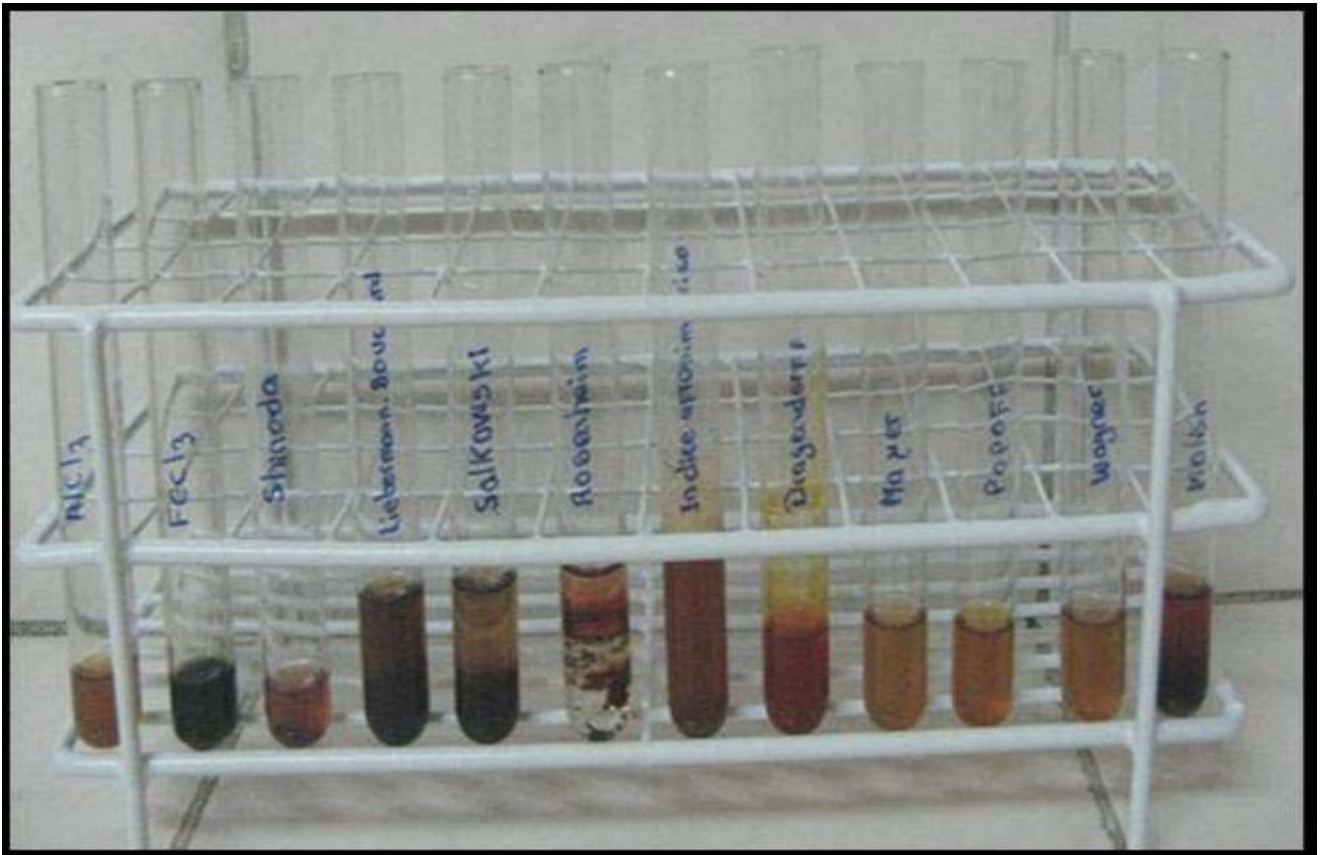


FIGURA 2



Rayos ultravioleta, halo amarillo, identificación de flavonoides.

ANEXO 4

8.4. Farmacología molecular

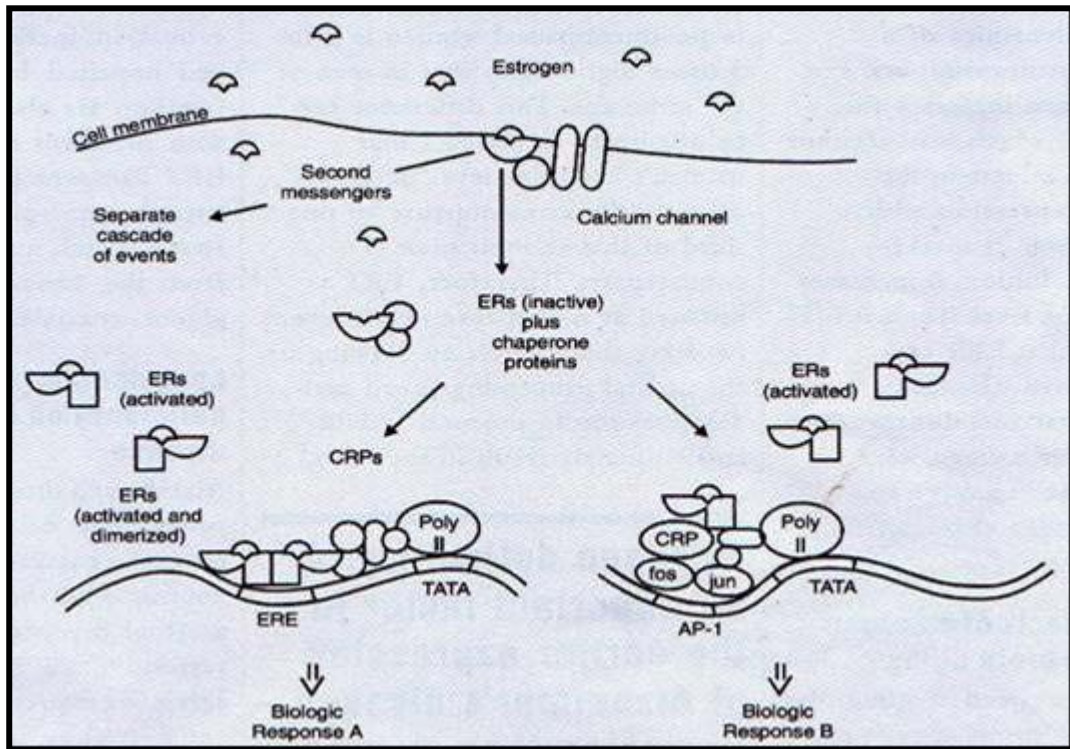


Grafico Nº 1 Adopted from Stanley J Birge et al ⁽⁸⁶⁾

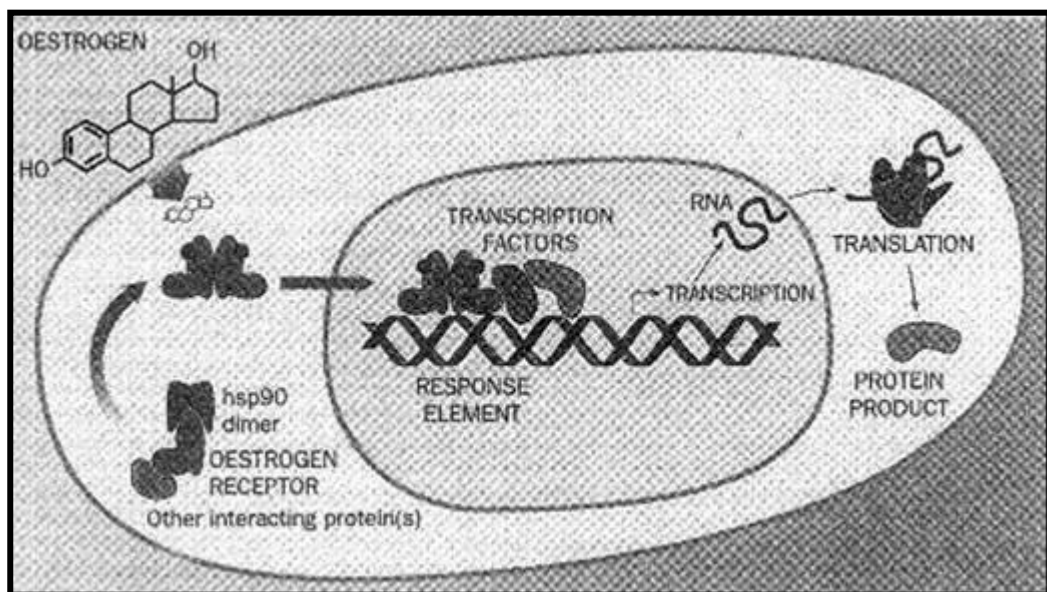


Grafico Nº 2 Adopted from George et al ⁽⁸⁷⁾

Antiestrogen

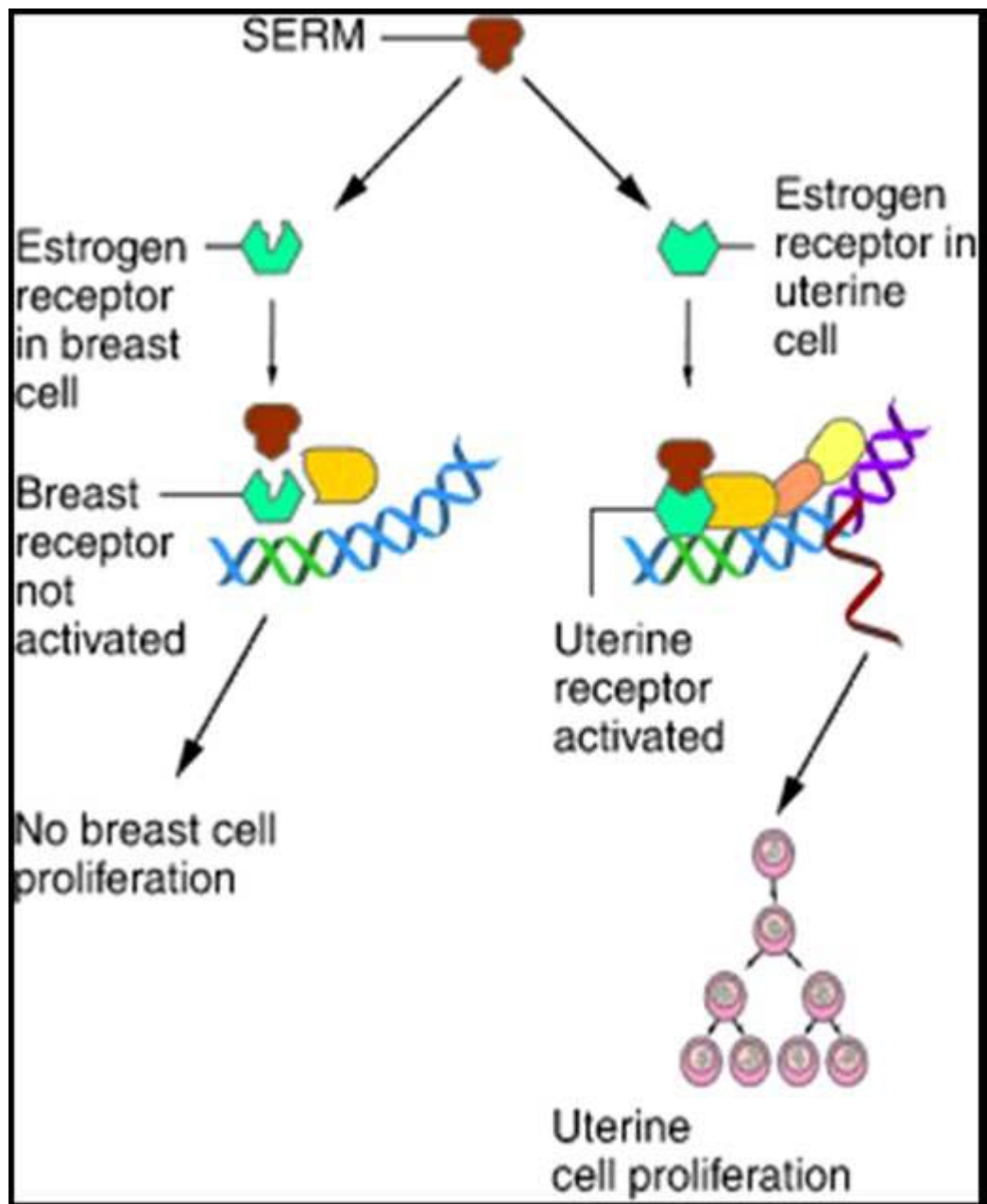


Grafico Nº 3

Clarke et al ⁽⁸⁹⁾



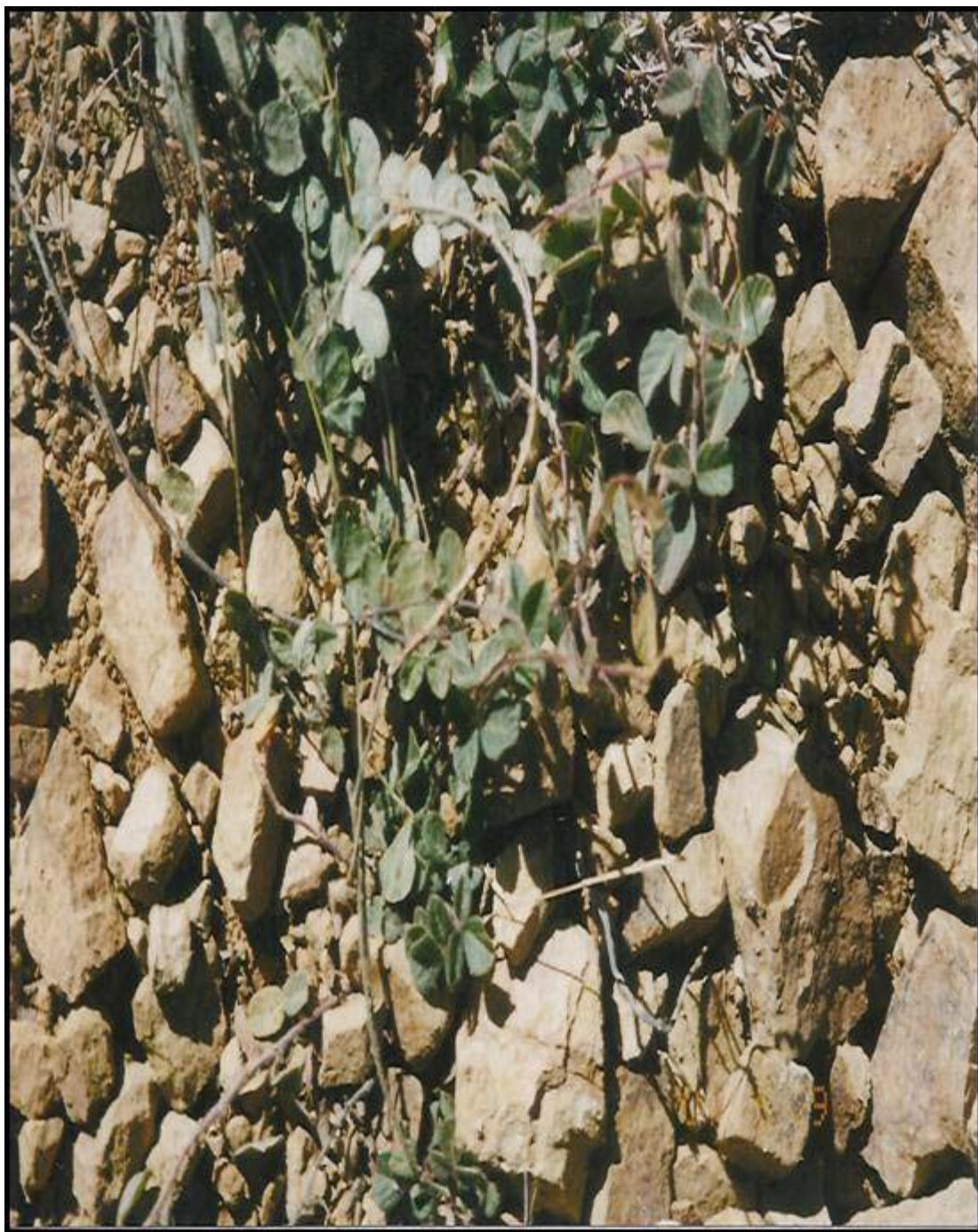
Agradecimiento Especial a la Magister Q.F.

JUANA ELVIRA CHÁVEZ FLORES y et al

Por sus orientaciones científicas farmacológicas dirigidas en el siglo XXI

ANEXO 5

8.5. Evidencias fotográficas y Documentación de identificación:



***Desmodium molliculum* (H.B.K.) C.D. “ Manayupa”
recolectada**

**Agosto 2004, Baños del Inca (Cajamarca).
Por Q.F. Fidel Ernesto Acaro Chuquicaña**

ANEXO 6



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

MUSEO DE HISTORIA NATURAL



CONSTANCIA N° 061- USM-2008

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa), recibida del Sr. **FIDEL ERNESTO ACARO CHUQUICAÑA**, ha sido estudiada y clasificada como: *Desmodium molliculum* (H.B.K.) DC., y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: FBALES

FAMILIA: FABACEAE

GENERO: *Desmodium*

ESPECIE: *Desmodium molliculum* (H.B.K.) DC

Nombre vulgar: "Manayupa"

Determinada por: Blgo. Severo Baldeón M.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de investigación.

Lima, 10 de Junio de 2008


Mg. Betty Milán Salazar
JEFA (e) DEL HERBARIO SAN

